

TESIS DOCTORAL

# **Caracterización de la histidina quinasa CbrA del sistema de dos componentes CbrAB de *Pseudomonas putida***

Memoria presentada por **Elizabet Monteagudo Cascales**  
para optar al grado de  
**Doctora en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química.**

Sevilla, Octubre de 2020

**Codirectora de la Tesis**

**Codirector de la Tesis**

**Dra. Inés Canosa Pérez-Fragero**

Profesora Titular

Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Universidad Pablo de Olavide

**Dr. Eduardo Santero Santurino**

Catedrático

Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Universidad Pablo de Olavide



Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica  
Programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química (RD: 99/2011)





## AGRADECIMIENTOS

Quizás esta sección suele ser la parte menos interesante de una tesis, pero es la que más valor tiene para quien la escribe.

Todavía recuerdo como si fuera ayer, aquel 1 de diciembre de 2016, esa risa nerviosa como respuesta a mi incrédula emoción tras haber sido becada para comenzar los estudios de doctorado. No tengo palabras para agradecer todo lo que me has aportado, no sólo conocimiento sino fortaleza en los momentos en los que más perdida me hallaba. Inés, gracias por ser mi directora, mi consejera, mi confidente y mi amiga. Y, por supuesto, agradecer a mi director Edu por su incommensurable sabiduría, su calidad humana y su confianza y apoyo durante mis años en el laboratorio. Mi andanza en la ciencia no hubiera sido posible sin ellos.

Sin pretensión de dejarme a nadie en el tintero **quisiera agradecer...**

A mi querida Rocío, porque nunca pensé que formaríamos una *partner* tan afín como CbrA y CbrB, por contar conmigo en cada momento importante de tu vida y por enseñarle a una pequeña *padawan* a sacar rayitos de luz en cada instante de oscuridad. Gracias también a Ricardo por comprender que no todos los Géminis somos iguales y por su aporte extra de ánimos y abrazos.

A Sofi por introducirme en el magnífico mundo de las *betas* y por despertarme el gusanillo de la investigación.

A Amando, Eva y Carlos por su interés en mis avances y por ser partícipes irreemplazables de todas las *micro*-celebraciones.

A Paqui por extenderme aquel abrazo de alegría y por nuestros momentos en los sofás donde supimos entendernos con una sola mirada.

A Fernan y Aroa por su implicación desinteresada en cualquier proyecto e idea independientemente del grado de locura y, en especial, a Aroa por ser la diseñadora de esta magnífica portada de Tesis.

A Guada por su admirable labor dentro y fuera del laboratorio, eres el sostén de toda esta gran *micro*-familia.

A Elena por mostrarme el enorme corazón que tiene, su generosidad y su pasión por la ciencia.

A los pequeños y no tan pequeños, Rubén, Magaly, Yolanda e Inma, por animar las jornadas con un mero “a seguir con más ahínco” o compartir esos deliciosos y volátiles chocolates procedentes del otro continente.

También a mis amigas de toda la vida, en especial a Alba, por su insistencia en que descubriera el elixir de la eterna juventud, a Carmen, por su fuente inagotable de positivismo y a Vicky, por su plena confianza en mí.

A Tino Krell y a los componentes del Servicio de Proteómica del CABD, Laura y Alejandro, deseo agradecer las aportaciones científicas gracias a las cuales este trabajo no hubiera sido tan fructífero.

A Javier por haberme acompañado en esta etapa de mi vida y, simplemente, por ser tú.

Por último, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional y, a Manuela y a Paco, con quienes me he sentido como en casa durante estos últimos años.

A todas aquellas personas que vieron algo en mí, gracias de corazón.

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>10</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>14</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. La familia <i>Pseudomonadaceae</i> .....</b>	<b>20</b>
1.1.1. <i>Pseudomonas putida</i> como modelo de bacteria ambiental.....	23
1.1.2. La regulación de la expresión génica en <i>Pseudomonas</i> .....	24
<b>1.2. Los sistemas reguladores de dos componentes (TCS) .....</b>	<b>29</b>
1.2.1. Sistema de transducción de señales por transferencia de grupos fosforilo .....	29
1.2.2. Proteínas sensoras en los TCS.....	31
1.2.2.1. Clasificación estructural de HKs .....	33
1.2.2.1.1. Dominios sensores de HKs.....	34
1.2.2.1.2. Dominios transductores de HKs.....	35
1.2.2.1.3. Dominios catalíticos de HKs .....	36
1.2.2.2. Clasificación de HKs en función de la topología.....	37
1.2.2.3. Clasificación de HKs en función de la naturaleza de la señal .....	39
1.2.3. Elementos reguladores de respuesta (RR) .....	42
1.2.4. Sistema de dos componentes activadores de promotores dependientes de $\sigma^N$ .....	44
<b>1.3. El sistema de dos componentes CbrAB .....</b>	<b>47</b>
1.3.1. La proteína sensora CbrA .....	47
1.3.2. El elemento regulador CbrB .....	49
1.3.3. Control global por CbrAB.....	50
<b>1.4. Otros sistemas reguladores de la asimilación del carbono en <i>Pseudomonas</i> .....</b>	<b>52</b>
1.4.1. Represión catabólica y modelo de regulación ejercida por Hfq/Crc.....	53
1.4.2. Factores sigma-antisigma: SigX.....	55
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>60</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1. Estirpes, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo .....</b>	<b>66</b>
3.1.1. Estirpes utilizadas en esta tesis .....	66
3.1.2. Plásmidos utilizados en esta tesis.....	68
3.1.3. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.....	72
3.1.4. Medios y condiciones de cultivo .....	74
3.1.5. Ensayos de viabilidad celular .....	75
3.1.5.1. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	75
3.1.5.1.1. Diluciones en gota en medio sólido .....	75
3.1.5.1.2. Diluciones en placas multipocillos.....	75
3.1.5.2. Determinación de la frecuencia de resistencia espontánea a estreptomicina...	77
3.1.6. Ensayo de movilidad en agar blando .....	77
3.1.7. Conservación de estirpes bacterianas .....	78
3.1.8. Estimación del tiempo de generación.....	78
<b>3.2. Manipulación de ácidos nucleicos .....</b>	<b>78</b>
3.2.1. Preparación de ADN cromosómico .....	78
3.2.2. Preparación de ADN plasmídico .....	78
3.2.3. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ....	79
3.2.4. PCR solapante .....	79
3.2.5. Mapeo de inserciones de miniTn5-Km mediante PCR de cebadores arbitrarios.....	81
3.2.6. Electroforesis de ADN .....	82
3.2.7. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN .....	83
3.2.8. Clonación de fragmentos de ADN en plásmidos.....	83
3.2.9. Transferencia de plásmidos por conjugación.....	84
3.2.10. Obtención de células competentes .....	84
3.2.11. Transferencia de plásmidos por transformación mediante choque térmico .....	85
3.2.12. Transferencia de plásmidos por electroporación.....	85

3.2.13. Secuenciación de ADN.....	86
3.2.14. Preparación de ARN total.....	86
3.2.15. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	87
3.2.16. Análisis por <i>Southern blotting</i> .....	87
3.2.16.1. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina.....	87
3.2.16.2. Hibridación de sondas de ADN ( <i>Southern blotting</i> ).....	88
<b>3.3. Obtención de estirpes mutantes en <i>P. putida</i> KT2442 .....</b>	<b>90</b>
3.3.1. Construcción de un mutante de delección $\Delta cbrX$ - <i>cbrA</i> , (MPO494) .....	90
3.3.2. Complementación del mutante de delección $\Delta cbrX$ - <i>cbrA</i> .....	92
3.3.3. Construcción de un mutante de delección $\Delta sigX$ , (MPO973) .....	94
3.3.4. Construcción de un mutante doble de delección en $\Delta crc$ y $\Delta sigX$ , (MPO974) .....	96
3.3.5. Obtención de mutantes supresores de CrcZ mediante mutagénesis por transposición .....	96
<b>3.4. Clonaciones en vectores de expresión .....</b>	<b>97</b>
3.4.1. Construcción de plásmidos con fusiones transcripcionales a <i>gfpmut3</i> .....	97
3.4.2. Construcción de plásmidos con fusiones transcripcionales y traduccionales a <i>lacZ</i> 97 .....	97
3.4.3. Construcción de plásmidos con versiones de la proteína CbrA.....	98
3.4.4. Construcción de plásmidos con CbrA y CbrA- $\Delta$ TM fusionados a GFP.....	99
3.4.5. Construcción de plásmidos para superproducir CbrA y CbrA- $\Delta$ TM .....	100
3.4.6. Construcción de plásmidos con fusión transcripcional de <i>crcZ</i> a genes de resistencia a antibióticos.....	101
<b>3.5. Análisis de la expresión génica .....</b>	<b>101</b>
3.5.1. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa .....	101
3.5.2. Cuantificación fluorimétrica de la expresión génica .....	102
3.5.3. Retrotranscripción de ARN.....	103
3.5.4. RT-PCR semicuantitativa .....	103
3.5.5. PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	104
<b>3.6. Manipulación de proteínas .....</b>	<b>105</b>

3.6.1. Obtención de extractos totales de cultivos bacterianos y separación de fracciones proteicas .....	105
3.6.2. Cuantificación de proteínas .....	105
3.6.3. Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS .....	106
3.6.4. Detección de proteínas separadas en PAGE por reconocimiento antígeno-anticuerpo ( <i>Western blotting</i> ) .....	107
3.6.5. Superproducción de proteínas en <i>Escherichia coli</i> .....	109
3.6.6. Purificación de la proteína truncada CbrA-ΔTM .....	109
<b>3.7. Técnicas de microscopía y análisis de imágenes .....</b>	<b>110</b>
3.7.1. Microscopía confocal de superresolución .....	110
<b>3.8. Medida de la estabilidad térmica por las interacciones proteína-ligando .....</b>	<b>111</b>
3.8.1. Fluorimetría diferencial de barrido .....	111
<b>3.9. Otros ensayos .....</b>	<b>112</b>
3.9.1. Cuantificación de nucleótidos de piridina .....	112
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>114</b>
<b>Capítulo 1. Regulación de la expresión de <i>cbrAB</i> .....</b>	<b>116</b>
4.1.1. Localización genómica de <i>cbrA-cbrB</i> .....	116
4.1.2. Identificación de la pauta abierta de lectura <i>cbrX</i> .....	117
4.1.2.1. Regulación de la expresión de <i>cbrX-cbrA</i> .....	120
4.1.2.2. Predicción de la estructura secundaria del ARNm de <i>cbrXA</i> .....	121
4.1.3. Caracterización de la función de <i>cbrX</i> sobre el sistema Cbr en <i>P. putida</i> .....	123
4.1.3.1. Construcción de un mutante de delección de <i>cbrX-cbrA</i> (Δ <i>cbrXA</i> , MPO494) de <i>P. putida</i> KT2442 .....	123
4.1.3.2. Caracterización fenotípica del mutante MPO494 (Δ <i>cbrXA</i> ) y complementación cromosómica .....	126
4.1.3.2.1. Utilización de distintas fuentes de carbono por las estirpes KT2442, MPO495 (Δ <i>cbrXA</i> ) y MPO498 (Δ <i>cbrXA-cbrXA</i> ) .....	127
4.1.3.2.2. Determinación de las condiciones de activación del sistema Cbr .....	129
4.1.3.2.3. Movilidad por <i>swimming</i> .....	134

4.1.3.3. Estudio del efecto regulador de <i>cbrX</i> sobre la expresión de <i>cbrA</i> .....	135
4.1.3.3.1. Efecto de <i>cbrX</i> sobre la traducción de <i>cbrA</i> .....	138
4.1.3.3.2. Efecto de <i>cbrX</i> sobre la transcripción de <i>cbrA</i> .....	140
4.1.3.3.3. Efecto de <i>cbrX</i> sobre la actividad de <i>cbrA</i> .....	142
4.1.4. Regulación de la expresión de CbrA y CbrB .....	143
<b>Capítulo 2. Caracterización funcional de los dominios de CbrA .....</b>	<b>145</b>
4.2.1. Caracterización fenotípica de los mutantes de delección de los dominios de CbrA .....	145
4.2.1.1. Análisis estructural de las versiones de CbrA truncadas .....	147
4.2.1.2. Análisis funcional de las versiones de CbrA truncadas .....	148
4.2.1.3. Utilización de distintas fuentes de carbono por las versiones de CbrA truncadas .....	149
4.2.2. Localización intracelular de las proteínas de CbrA .....	153
4.2.2.1. Análisis por <i>Western blotting</i> .....	153
4.2.2.2. Microscopía confocal de superresolución .....	155
<b>Capítulo 3. Determinación de la naturaleza de la señal activadora del sistema CbrAB .....</b>	<b>157</b>
4.3.1. Expresión y purificación de las proteínas CbrA silvestre y CbrA- $\Delta$ TM fusionadas a la inteína .....	157
4.3.2. Estudio de la interacción de CbrA- $\Delta$ TM con distintos ligandos mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF) .....	161
4.3.2.1. Optimización de las condiciones de máxima estabilidad de la proteína CbrA- $\Delta$ TM para el ensayo de DSF .....	163
4.3.2.2. Rastreo de posibles ligandos que interaccionen con CbrA- $\Delta$ TM .....	166
4.3.2.3. Predicción de ligandos en función de la estructura del dominio PAS .....	169
4.3.2.4. Titulación de los ligandos predichos para CbrA- $\Delta$ TM mediante DSF .....	170
<b>Capítulo 4. Estudio de la posible interacción entre distintos sistemas reguladores en la asimilación de carbono en <i>P. putida</i> .....</b>	<b>174</b>
4.4.1. El regulón de Hfq/Crc .....	174
4.4.1.1. Efecto de Hfq/Crc sobre la expresión de <i>cbrA</i> y <i>cbrB</i> .....	175

4.4.1.2. Efecto de Crc en la expresión de <i>crcZ</i> , <i>crcY</i> y otras dianas del sistema Cbr..	178
4.4.2. Interacción con el factor sigma SigX .....	180
4.4.2.1. Estudio de la expresión de <i>crcZ</i> en los fondos genéticos $\Delta sigX$ y $\Delta crc\Delta sigX$ .	180
4.4.3. Búsqueda de elementos reguladores adicionales que interaccionan con CbrAB..	182
4.4.3.1. Localización de las inserciones en la mutagénesis por transposición.....	184
4.4.3.1.1. Clasificación de los mutantes en función de la resistencia a estreptomicina .....	184
4.4.3.1.2. Clasificación funcional de los mutantes por transposición.....	187
4.4.3.2. Caracterización fenotípica de los mutantes supresores por transposición.....	190
4.4.3.2.1. Estimación de la concentración mínima inhibitoria de los mutantes supresores .....	190
4.4.3.2.2. Estudio del estado <i>redox</i> y energético de los mutantes supresores mediante HPLC.....	192
4.4.3.2.3. Medida de la expresión de <i>crcZ</i> en los mutantes supresores.....	194
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>196</b>
5.1. El acoplamiento traduccional de <i>cbrX</i> sobre <i>cbrA-cbrB</i> .....	198
5.2. El papel de CbrAB en la fisiología de <i>Pseudomonas</i> .....	200
5.3. El circuito de retroregulación del sistema CbrAB .....	203
5.4. El solapamiento de sistemas reguladores y su efecto en la discriminación por fuente de carbono .....	204
5.5. Las peculiaridades estructurales de CbrA: Transporte y señalización en una misma molécula .....	207
5.6. La naturaleza de la señal activadora del sistema CbrAB en <i>P. putida</i> .....	210
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>214</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>218</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>260</b>
Anexo I. Clasificación de los genes interrumpidos por el transposón miniTn5-Km en los mutantes resistentes a estreptomicina seleccionados .....	262



## Abreviaturas

**aa:** Aminoácido

**ABC:** (*ATP Binding Casette*)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ADP:** Adenosín 5'-difosfato

**Am:** Apramicina

**AMPc:** Adenosín monofosfato-3',5' cíclico

**A<sub>n</sub>:** Absorbancia a n nanómetros

**Ap:** Ampicilina

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNp:** ARN pequeño

**ARNP:** ARN polimerasa

**ARNr:** ARN ribosómico

**ARNt:** ARN transferente

**ATP:** Adenosín 5'-trifosfato

**BSA:** Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

**CA:** Dominio catalítico de unión a ATP (*Catalytic ATP-binding*)

**Cb:** Carbenicilina

**CCR:** Represión catabólica (*Carbon Catabolite Repression*)

**ChIP-Seq:** (*Chromatin ImmunoPrecipitation and Sequencing*)

**Cit:** Citrato

**Cm:** Cloranfenicol

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DHp:** Dominio de dimerización y fosfotransferencia (*Dimerization and Histidine phosphotransfer*)

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato

**DSF:** Fluorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Fluorimetry*)

**DTT:** Ditioneitol

**bEBP:** Proteínas bacterianas de unión a potenciadores (*bacterial Enhancer Binding Protein*)

**ECF:** Función extracitoplásmica (*Extracytoplasmic Function*)

**EDTA:** Ácido etilendiaminetetracético

**FLP:** Flipasa

**FRT:** Diana de reconocimiento de la flipasa (*Flipase Recognition Target*)

**GAF:** (*cGMP phosphodiesterase-Adenylyl cyclase-FhlA*)

**GFP:** Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)

**Glu:** Glucosa

**Gm:** Gentamicina

**GRAS:** (*Generally Recognized As Safe*)

**GTP:** Guanosina trifosfato

**h:** Hora

**HAMP:** (*Histidine kinase, Adenylyl cyclase, Methyl-accepting protein and Phosphatase*)

**HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico

**His:** Histidina

**HK:** Histidina quinasa (*Histidine-Kinase*)

**HTH:** Hélice-giro-hélice (*Helix-Turn Helix*)

**IHF:** Factor de integración de hospedador (*Integration Host Factor*)

**IPTG:** Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

**kb:** Kilobase

**kDa:** Kilodalton

**Km:** Kanamicina

**LB:** Medio Luria-Bertani

**MCP:** Proteínas de quimiotaxisceptoras de metilo (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*)

**MES:** Ácido 2-morfolinoetanosulfónico

**MH:** Medio Mueller Hinton

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration*)

**min:** Minuto

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**MM:** Medio mínimo

**NAD<sup>+</sup>(H):** Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada/reducida)

**NADP<sup>+</sup>(H):** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada/reducida)

**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

**NCCLS:** Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)

**NIH:** Institutos Nacionales de la Salud (*National Institutes of Health*)

**OAA:** Oxalacetato

**ONPG:** Orto-nitrofenil- β-D-galactopiranosido

**ORF:** Pauta abierta de lectura (*Open Reading Frame*)

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*)

**PAS:** Per-ARNT-Sim

**pb:** Par de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

**PEG:** Polietilenglicol

**PDB:** (*Protein Data Bank*)

**P<sub>i</sub>:** Fosfato inorgánico

**p/v:** Relación peso/volumen

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación

**RBS:** Sitio de unión al ribosoma (*Ribosome Binding Site*)

**RFU:** Unidades de fluorescencia relativa (*Relative Fluorescence Units*)

**Rif:** Rifampicina

**RND:** (*Resistance-Nodulation-Division*)

**rpm.:** Revoluciones por minuto

**RR:** Regulador de respuesta (*Response Regulator*)

**RT:** Retrotranscripción.

**RT-PCR:** PCR con transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real (*Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

**σ:** Factor sigma

**Sac:** Sacarosa

**SD:** Desviación estándar (*Standard Deviation*)

**SDS:** Dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

**Scc:** Succinato

**Sm:** Estreptomina

**SOB:** (*Super Optimal Broth*)

**SOC:** SOB suplementado con glucosa

**Sp:** Espectinomicina

**STAC:** (*Solute carrier 5 (SLC)-Two component signal transduction Associated Component*)

**TAE:** Tris-Acetato-EDTA

**TB:** Tris buffer

**TBE:** Tris-Borato-EDTA

**TBS:** Tris buffer salino

**Tc:** Tetraciclina

**TCS:** Sistema de dos componentes (*Two-Component System*)

**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametiletildiamina  
**TER:** Tris-EDTA-ARNsa  
**TFs:** Factores transcripcionales  
**TM:** Transmembrana  
**TSS:** Sitio de inicio de la transcripción (*Transcription Star Site*)  
**TTBS:** Tween 20-TBS  
**u.a.:** Unidades arbitrarias  
**ufc:** Unidades formadoras de colonia  
**U.M.:** Unidades Miller  
**UTP:** Uridina trifosfato  
**UTR:** Región no traducida (*UnTranslated Region*)  
**v/v:** Relación volumen/volumen  
**wt:** Silvestre (*wild-type*)  
**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido

## Índice de figuras

Figura 1. Árbol filogenético de los principales grupos de especies del género <i>Pseudomonas</i> basado en el análisis de secuencia del ARN ribosómico 16S .....	21
Figura 2. Distribución de proteínas de transducción de señales en diferentes filos bacterianos.....	27
Figura 3. Esquema del prototipo de sistema de dos componentes bacteriano .....	30
Figura 4. Mecanismos de fosforilación entre histidina quinasas y su regulador de respuesta .....	32
Figura 5. Arquitectura de dominios en proteínas histidina quinasas en sistemas de dos componentes .....	34
Figura 6. Arquitectura modular de histidina quinasas con dominio SLC5 en diferentes organismos ...	37
Figura 7. Mecanismo de recepción de la señal en histidina quinasas .....	38
Figura 8. Clasificación de la superfamilia de reguladores de respuestas en bacterias .....	43
Figura 9. Mecanismo de activación de la transcripción de promotores dependientes del factor $\sigma^N$ .....	45
Figura 10. Mecanismo de activación de reguladores de respuesta tipo NtrC.....	46
Figura 11. Diagrama de los dominios conservados en CbrA de <i>P. putida</i> KT2440 .....	48
Figura 12. Diagrama de los dominios conservados en CbrB de <i>P. putida</i> KT2440 .....	50
Figura 13. Mecanismo de regulación post-transcripcional del complejo Hfq/Crc en <i>P. putida</i> .....	54
Figura 14. Esquema general del mecanismo de transducción de señales dependiente de factores $\sigma^{ECF}$ .....	56
Figura 15. Esquema del mecanismo de activación y las funciones fisiológicas del factor $\sigma^{ECF}$ SigX en <i>P. aeruginosa</i> .....	58
Figura 16. Diagrama del proceso de determinación de la MIC por el método de dilución en gotas.....	76
Figura 17. Esquema de una PCR solapante.....	80
Figura 18. Mapeo de inserciones del transposón miniTn5-Km mediante PCR con cebadores arbitrarios .....	82
Figura 19. Esquema del sistema de transferencia en pirámide de ADN a membrana por capilaridad.....	88
Figura 20. Construcción del mutante de delección $\Delta cbrX-cbrA$ .....	91
Figura 21. Construcción del mutante de delección $\Delta sigX$ .....	95
Figura 22. Esquema de la transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ Transfer System RTA Transfer (Bio-Rad) .....	108
Figura 23. Esquema del proceso de purificación de proteínas fusionadas en su extremo C-terminal según IMPACT™ kit.....	109
Figura 24. Organización genómica del locus <i>cbrA-cbrB-crcZ</i> en la familia <i>Pseudomonadaceae</i> .....	117
Figura 25. Organización genómica del locus <i>cbrX-cbrA-cbrB</i> en <i>Pseudomonas putida</i> .....	118
Figura 26. Conservación de la secuencia de CbrX y predicción de estructura secundaria .....	119
Figura 27. Estudio de la cotranscripción de <i>cbrX</i> y <i>cbrA</i> .....	121
Figura 28. Predicción de estructura secundaria del ARNm de la secuencia de <i>cbrXA</i> .....	122
Figura 29. Patrón de restricción en <i>P. putida</i> KT2442 y los mutantes MPO493 y MPO494 tras la digestión con las enzimas <i>Bam</i> HI, <i>Sall</i> , <i>Eco</i> RI e <i>Hind</i> III.....	124

Figura 30. Análisis por <i>Southern blot</i> de las estirpes KT2442, MPO493 y MPO494. ....	125
Figure 31. Análisis <i>in vivo</i> de la expresión de <i>cbrA</i> en la estirpe MPO494 ( $\Delta cbrXA$ ) .....	126
Figura 32. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442, mutante de delección $\Delta cbrXA$ y mutante complementado $\Delta cbrXA-cbrXA$ en diferentes fuentes de carbono.....	128
Figura 33. Expresión de <i>crcZ</i> , <i>crcY</i> y <i>PP2810</i> en las estirpes silvestre MPO451, MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ) y MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ ) de <i>P. putida</i> en diferentes fuentes de carbono.....	130
Figura 34. Niveles de expresión de <i>crcZ</i> , <i>crcY</i> y <i>PP2810</i> en <i>P. putida</i> KT2442, mutante $\Delta cbrXA$ y mutante complementado a las 8 h de inducción en diversas fuentes de carbono.....	131
Figura 35. Niveles de expresión de <i>crcZ</i> y <i>PP2810</i> en <i>P. putida</i> KT2442 y en el mutante $\Delta cbrXA$ ...	133
Figura 36. Ensayo de movilidad por <i>swimming</i> en agar blando.....	134
Figura 37. Mutagénesis puntual de la secuencia de <i>cbrX</i> .....	136
Figura 38. Predicción de estructura secundaria del ARNm de los diferentes mutantes en <i>cbrX</i> .....	137
Figura 39. Efecto de las mutaciones puntuales de <i>cbrX</i> en la expresión de CbrA .....	139
Figura 40. Análisis por RT-PCR de la unidad transcripcional <i>cbrX-cbrA</i> .....	141
Figura 41. Medida de la expresión <i>in vivo</i> de <i>crcZ</i> en <i>P. putida</i> KT2442 y en mutantes con variantes de CbrX .....	143
Figura 42. Medida de la expresión <i>in vivo</i> de CbrA en <i>P. putida</i> KT2442 y en los fondos mutantes $\Delta cbrXA$ y $\Delta cbrB$ .....	144
Figura 43. Esquema de las versiones de CbrA silvestre y mutantes en sus dominios PAS y TM.....	146
Figura 44. Niveles de expresión de <i>PP2810</i> en las estirpes con las versiones truncadas de los dominios $\Delta TM$ y $\Delta PAS$ de CbrA .....	148
Figura 45. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y los mutantes $\Delta cbrXA$ , $\Delta PAS$ , $\Delta TM$ y $P_{tac}-\Delta TM$ en diferentes fuentes de carbono.....	150
Figura 46. Análisis de la expresión de <i>PP2810</i> en la estirpe mutante complementada con la versión CbrA silvestre o las versiones de CbrA truncadas en diferentes fuentes de carbono .....	152
Figura 47. Detección de la proteína CbrA y la versión truncada CbrA- $\Delta TM$ fusionadas a GFP mediante <i>Western blotting</i> .....	154
Figura 48. Visualización de la proteína CbrA y su versión soluble CbrA- $\Delta TM$ mediante microscopía confocal .....	156
Figura 49. Superproducción de CbrA y CbrA- $\Delta TM$ en el plásmido pTXB1.....	158
Figura 50. Superproducción de CbrA nativa en las estirpes de <i>E. coli</i> ER2566 y BL21(DE3) pLysS	159
Figura 51. Gel de acrilamida con las diferentes fracciones de la superproducción y purificación de CbrA- $\Delta TM$ .....	160
Figura 52. Principio de la fluorimetría diferencial de barrido (DSF) .....	162
Figura 53. Efecto del tipo de tampón, el pH y la concentración salina en la termoestabilidad de la proteína CbrA- $\Delta TM$ .....	165
Figura 54. Cribado de alto rendimiento para la detección de ligandos de la proteína CbrA- $\Delta TM$ mediante fluorimetría diferencial de barrido.....	168
Figura 55. Evaluación de la termoestabilidad de CbrA- $\Delta TM$ con el ácido <i>p</i> -cumárico por fluorimetría diferencial de barrido.....	170

Figura 56. Estabilidad de la proteína CbrA- $\Delta$ TM en función de la concentración de L-tirosina, L-treonina, L-triptófano, D-(+)-glucosa 6P, NADPH .....	172
Figura 57. Localización de posibles sitios de unión de Hfq/Crc en las regiones promotoras de <i>cbrA</i> y <i>cbrB</i> .....	175
Figura 58. Medida de la expresión <i>in vivo</i> de CbrA mediante fusión traduccional a <i>lacZ</i> en <i>P. putida</i> KT2442 y en el mutante $\Delta$ <i>crc</i> .....	176
Figura 59. Análisis <i>in vivo</i> de la expresión de <i>cbrA</i> y <i>cbrB</i> mediante fusiones transcripcionales a <i>lacZ</i> en <i>P. putida</i> KT2442 y en el mutante $\Delta$ <i>crc</i> .....	178
Figura 60. Análisis <i>in vivo</i> de la expresión de <i>crcZ</i> , <i>crcY</i> y <i>PP2810</i> en <i>P. putida</i> KT2442 y en el fondo mutante $\Delta$ <i>crc</i> .....	179
Figura 61. Niveles de expresión de <i>crcZ</i> en <i>P. putida</i> KT2442 y en los fondos $\Delta$ <i>crc</i> , $\Delta$ <i>sigX</i> y $\Delta$ <i>crc</i> $\Delta$ <i>sigX</i> .....	181
Figura 62. Resistencia a estreptomicina de las estirpes silvestre (MPO540) y mutante $\Delta$ <i>crc</i> (MPO548) mediante ensayos de dilución en gota .....	183
Figura 63. Clasificación de los mutantes seleccionados en función de su resistencia a estreptomicina mediante ensayo de dilución en gota.....	186
Figura 64. Determinación de la concentración mínima inhibitoria a estreptomicina de los mutantes seleccionados.....	191
Figura 65. Balances <i>redox</i> y energético de los mutantes resistentes a estreptomicina .....	193
Figura 66. Medida de la expresión de <i>crcZ</i> en los mutantes resistentes a estreptomicina.....	194
Figura 67. Modelo de regulación del sistema CbrAB en <i>P. putida</i> .....	206

## Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de proteínas de transducción de señales en diferentes clases del filo <i>Proteobacteria</i> .....	28
Tabla 2. Selección de algunas histidina quinasas pertenecientes a TCS con señales caracterizadas 41	
Tabla 3. Tabla de estirpes.....	66
Tabla 4. Tabla de plásmidos .....	68
Tabla 5. Tabla de oligonucleótidos.....	72





## INTRODUCCIÓN



### 1.1. La familia *Pseudomonadaceae*

La familia *Pseudomonadaceae* englobada dentro del orden *Pseudomonadales* y la clase de  $\gamma$ -proteobacterias, comprende quince géneros bacterianos (*Pseudomonas* (I), *Azomonas* (II), *Azotobacter* (III), *Cellvibrio* (IV), *Chryseomonas* (V), *Flavimonas* (VI), *Lamprapedia* (VII), *Mesophylobacter* (VIII), *Merococcus* (IX), *Olipella* (X), *Rhizobacter* (XI), *Regamonas* (XII), *Serpeas* (XIII), *Thermoleophylus* (XIV) y *Xylophylus* (XV)) agrupados en base a la similitud de secuencias del ARN ribosómico 16S (Garritty et al., 2001). Dentro de esta familia destacan los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* por sus implicaciones ambientales, clínicas y sus aplicaciones biotecnológicas.

El género bacteriano *Pseudomonas*, propuesto por primera vez a finales del siglo XIX por Migula (Migula, 1894), es uno de los géneros más complejos y extenso a nivel taxonómico. Según el *Approved List of Bacterial Names* (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>) actualmente se han descrito 273 especies diferentes pertenecientes a este género, y se clasifican en 7 grupos (*P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* y *P. pertucinogena*) (Anzai et al., 2000; Peix et al., 2018) (Figura 1).

En los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de marcadores moleculares filogenéticos capaces de clasificar especies bacterianas estrechamente relacionadas donde la técnica del ARNr 16S presentaba sus limitaciones. El análisis de secuencias multilocus (MLSA, del inglés *MultiLocus Sequence Analysis*) basado en la comparación de secuencia de cuatro genes *housekeeping* (ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*) proporciona un nuevo enfoque para la identificación de nuevas especies del género *Pseudomonas* (Gomila et al., 2015; Mulet et al., 2012a, b).

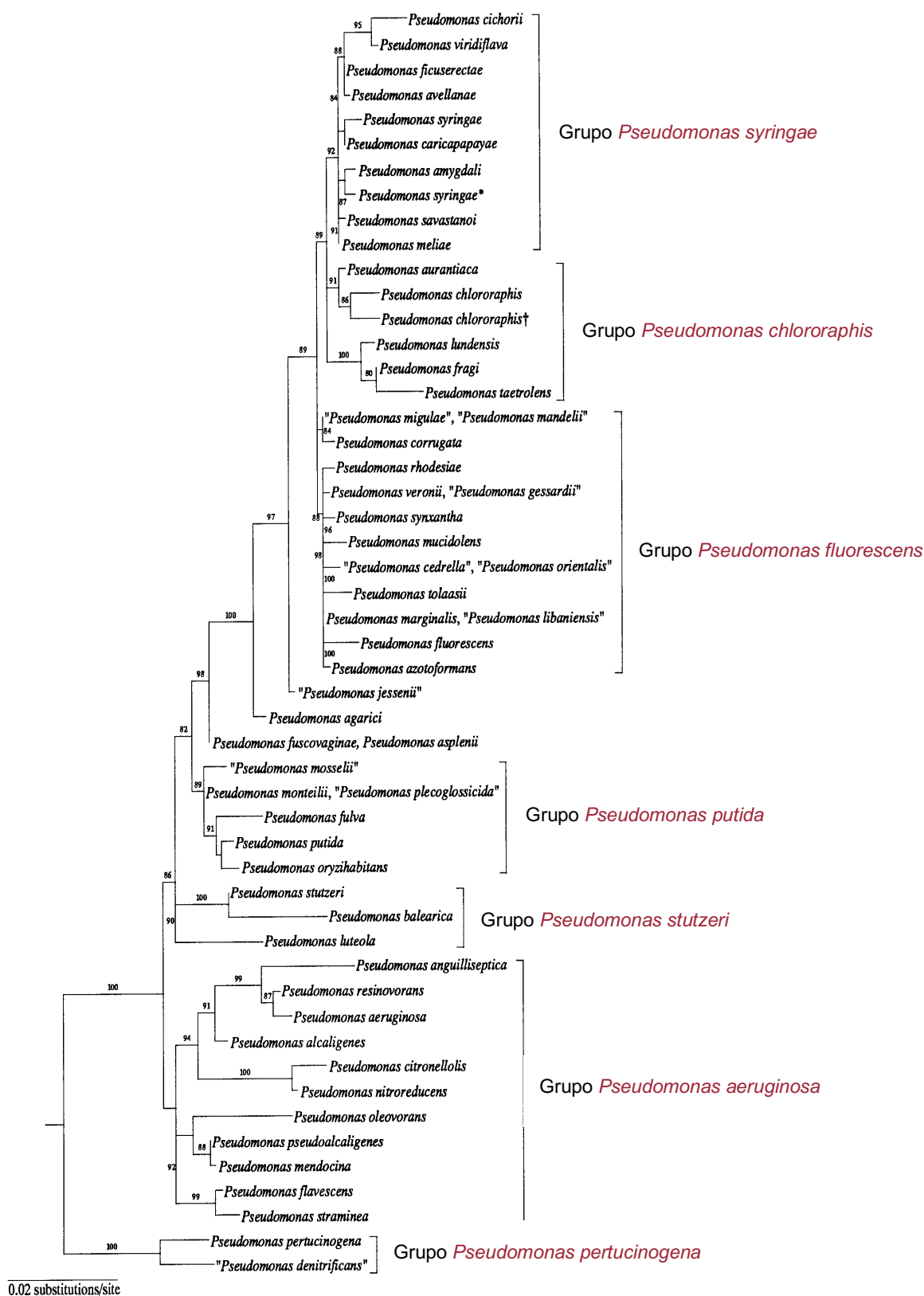


Figura 1. Árbol filogenético de los principales grupos de especies del género *Pseudomonas* basado en el análisis de secuencia del ARN ribosómico 16S. Como raíz se utilizó el organismo *Escherichia coli* (V00348). Modificado de (Anzai et al., 2000).

En general, las bacterias pertenecientes a este género son bacilos Gram-negativos rectos o ligeramente curvados, quimioorganotrofos, móviles gracias a uno o varios flagelos polares, no esporulantes, oxidasa y catalasa positivos y aerobios estrictos aunque a veces son capaces de usar nitratos como fuente alternativa de electrones, permitiéndoles crecer en anaerobiosis (Palleroni & Moore, 2004). Se caracterizan por ser bacterias ubicuas con una gran capacidad de adaptarse y colonizar hábitats tan diversos como animales, plantas, suelos, ambientes acuáticos o la rizosfera (Lugtenberg & Dekkers, 1999; Palleroni & Moore, 2004). Gracias a su enorme versatilidad metabólica, fisiológica y genética se les atribuyen funciones tan importantes como el reciclaje y la degradación de una gran diversidad de compuestos recalcitrantes en biorremediación, deterioro de alimentos, patogénesis oportunistas de animales, insectos y de plantas, estimulación del crecimiento de las plantas mediante fijación de nitrógeno o la producción de determinados compuestos actuando como bioplaguicidas, etc. (Bodey et al., 1983; Silby et al., 2011; Timmis, 2002). A menudo encontramos también bacterias resistentes a agentes antibacterianos como metales pesados, desinfectantes, detergentes o solventes orgánicos (Ramos et al., 2002), productoras de pigmentos y sideróforos (Meyer et al., 2002) e incluso algunas son resistentes a un extenso directorio de antibióticos suponiendo cada año un gran problema de salud pública a nivel mundial (Aloush et al., 2006; Raman et al., 2018). Los genomas del género *Pseudomonas* oscilan en tamaño de 5.5 a 7 Mpb con un contenido en G+C entorno al 65-67 % aproximadamente (Klockgether et al., 2011; Lee et al., 2006).

*P. aeruginosa* es la especie mejor caracterizada genéticamente del género *Pseudomonas*. Su genoma fue el primero de la familia en secuenciarse (Stover et al., 2000) y la extensa información que existe de ella se debe principalmente a su importancia clínica, siendo responsable de múltiples infecciones nosocomiales graves como neumonía, infecciones del tracto urinario o sepsis (D'Argenio et al., 2007; Lee et al., 2013; Lister et al., 2009). Aunque este género sea comúnmente conocido por las infecciones causadas en humanos, también son capaces de producir infecciones en plantas (*P. syringae*) y/o insectos (*P. entomophila*) (Silby et al., 2011; Vodovar et al., 2006). *P. syringae* es el clásico ejemplo de bacteria fitopatógena. Dentro de las variantes patógenas, la más estudiada es *P. syringae* pv. tomato DC3000 patógeno de *Arabidopsis thaliana* y de la planta del tomate, *Solanum lycopersicum* (Buell et al., 2003).

Por otra parte, *P. fluorescens* y *P. rhizophrae* habitan la rizosfera de muchas plantas desempeñando funciones esenciales en la estimulación de su crecimiento. Junto a *P. chlororaphis* actúan como agentes en el biocontrol de comunidades microbianas a través de la producción de un amplio espectro de antibióticos y metabolitos secundarios (Anderson &

Kim, 2018; Haas & Defago, 2005; Paulsen et al., 2005; Peix et al., 2003; Qi et al., 2009; Silby et al., 2009). Otros ejemplos de *Pseudomonas* son *P. stutzeri* y *P. mendocina*, potentes biorremediadores que participan en procesos de desnitrificación aeróbica de efluentes residuales (Deng et al., 2014; Zhang et al., 2019).

El género *Azotobacter* está constituido por siete especies (*A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* y *A. salinestri*) y comparte con el género *Pseudomonas* la enorme diversidad genómica y adaptabilidad genética en los diversos nichos ecológicos donde habitan. Entre sus similitudes, destacan el contenido en G+C de sus genomas (63-67.5 %) (Setubal et al., 2009) (el genoma de *A. vinelandii* comparte un 96 % de identidad con *P. aeruginosa* PAO1 (Özen & Ussery, 2012)), múltiples rutas metabólicas y bioquímicas como la fijación de nitrógeno (Yan et al., 2008; Young & Park, 2007), la producción de alginato (Clementi, 1997) y la acumulación de gránulos de poli-  $\beta$ -hidroxibutirato como almacenamiento de fuente de carbono y energía (Stevenson & Socolofsky, 1966). Sin embargo, *Pseudomonas* y *Azotobacter* difieren entre otros aspectos en morfología celular y motilidad (Palleroni, 2005).

#### 1.1.1. *Pseudomonas putida* como modelo de bacteria ambiental

*P. putida* es un organismo aislado de suelos y aguas templadas, de fácil manejo y cultivo en el laboratorio dado su rápido crecimiento bajo condiciones copiotrofas y sus sencillos requerimientos nutricionales. La estirpe KT2440 de *P. putida*, certificada por el *National Institutes of Health* (NIH) de los Estados Unidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Federal Register, 1982), es empleada como microorganismo modelo seguro para estudios de biodegradación y adaptación a diversos ambientes así como en el desarrollo de herramientas biotecnológicas dada su inocuidad (Martins dos Santos et al., 2004b; Wackett, 2003). Se aisló por primera vez en Japón y proviene de *P. arvilla* estirpe mt-2 curada del plásmido TOL pWWO el cual le proporcionaba la capacidad de emplear xilenos y tolueno como fuente de carbono y energía (Franklin et al., 1981; Nakazawa, 2003; Williams & Murray, 1974). En esta tesis, se emplea la estirpe *P. putida* KT2442 mutante espontáneo en la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa de la estirpe KT2440 lo que le confiere resistencia a rifampicina (Jatsenko et al., 2010). Su genoma posee un tamaño de 6.18 Mpb y un contenido en G+C del 61.6 %. A pesar de compartir un 85 % de similitud con el genoma del patógeno *P. aeruginosa*, no contiene factores de virulencia como la exotoxina A, ciertas enzimas hidrolíticas y sistemas de secreción tipo III (Nelson et al., 2002).

*P. putida* desempeña un papel esencial en detoxificación, biorremediación y posee un potencial biotecnológico inigualable. Esta extraordinaria versatilidad metabólica implica la participación de elementos móviles en la adquisición y expresión heteróloga de genes de nuevas rutas metabólicas procedentes de otros microorganismos, según reveló el análisis genómico de esta bacteria. La mayoría de los fenotipos degradadores de esta bacteria vienen codificados en plásmidos catabólicos. Algunos ejemplos de estos plásmidos son TOL pWWO en la estirpe *P. putida* mt-2 (Williams & Murray, 1974), el plásmido OCT en la estirpe *P. putida* GPo1 (Rojo et al., 1987), el plásmido NAH7 en la estirpe *P. putida* PpG7 (Dunn & Gunsalus, 1973) y el plásmido CAM en la estirpe *P. putida* PpG1 (Rheinwald et al., 1973), que codifican genes del catabolismo del tolueno, alcanos, naftaleno y alcanfor, respectivamente.

*P. putida* KT2440 suscita un gran interés biotecnológico dada la capacidad de producir compuestos de alto valor añadido como enzimas de interés comercial, derivados de catecoles, compuestos heterocíclicos o polihidroxialcanoatos (PHA) (Schmid et al., 2001). Además, posee una notable tolerancia a condiciones de estrés como el estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la presencia de compuestos orgánicos (Kim & Park, 2014; Nikel & de Lorenzo, 2014) convirtiéndola así en el microorganismo idóneo para aplicaciones biotecnológicas y medioambientales.

### 1.1.2. La regulación de la expresión génica en *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* se denominan oportunistas nutricionales dado que comparten la peculiar habilidad de degradar y utilizar una enorme variedad de moléculas como nutrientes, entre ellos, compuestos recalcitrantes generados por humanos. La impresionante versatilidad metabólica que caracteriza a *Pseudomonas* va en concordancia con el número de genes en su genoma destinados a potenciar su adaptación metabólica ante cambios drásticos en las condiciones ambientales (Galperin, 2005, 2010; Nelson et al., 2002). Además de los genes estructurales esenciales para dotar a la bacteria de características básicas, la eficiente capacidad de adaptación a fluctuaciones del medio radica en la presencia de múltiples sistemas reguladores capaces de detectar las condiciones externas, y ajustar la fisiología celular en función de las mismas (Cases et al., 2003a; Whitworth & Cock, 2009).

Los mecanismos de regulación de la expresión génica pueden ser muy simples, como en el caso de los sistemas de un componente (OCS, *One Component System*), en los que una proteína reguladora contiene dominios de entrada y de salida, reconoce una señal y actúa en consecuencia (Ulrich et al., 2005), o pueden ser modelos más complejos que implican todo

un sistema de transducción de señales. En bacterias, existen distintos tipos de sistemas de transducción de señales que, dependiendo del mecanismo de transducción, se clasifican en:

a. Sistemas de transducción que no implican fosforilación:

- ◆ Sistemas regulados por un mensajero secundario intracelular: Por ejemplo, el AMPc, que está sintetizado por la adenilato ciclasa (AC) o, el di-GMPc generado por las proteínas diguanilato ciclasa (dominio GGDEF) y di-GMPc fosfodiesterasa (dominio EAL). Los dominios conservados GGDEF y EAL, denominados así por sus aminoácidos conservados, están presentes en otras proteínas con funciones similares como WspR y PvrR en *P. aeruginosa*. Otras proteínas con dominios similares a GGDEF, denominado HD-GYP, son capaces de hidrolizar directamente di-GMPc en dos moléculas de GMP (Normand et al., 2015).
- ◆ Sistemas basados en la interacción proteína-proteína: Un representante de este tipo es el sistema de fijación de nitrógeno NifLA en *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii* y *P. stutzeri* donde la formación del complejo proteico NifL-NifA previene la activación transcripcional de promotores  $\sigma^N$  en condiciones de exceso de nitrógeno (Dixon, 1998; Martínez-Argudo et al., 2004).

b. Sistemas de transducción basados en fosforilación:

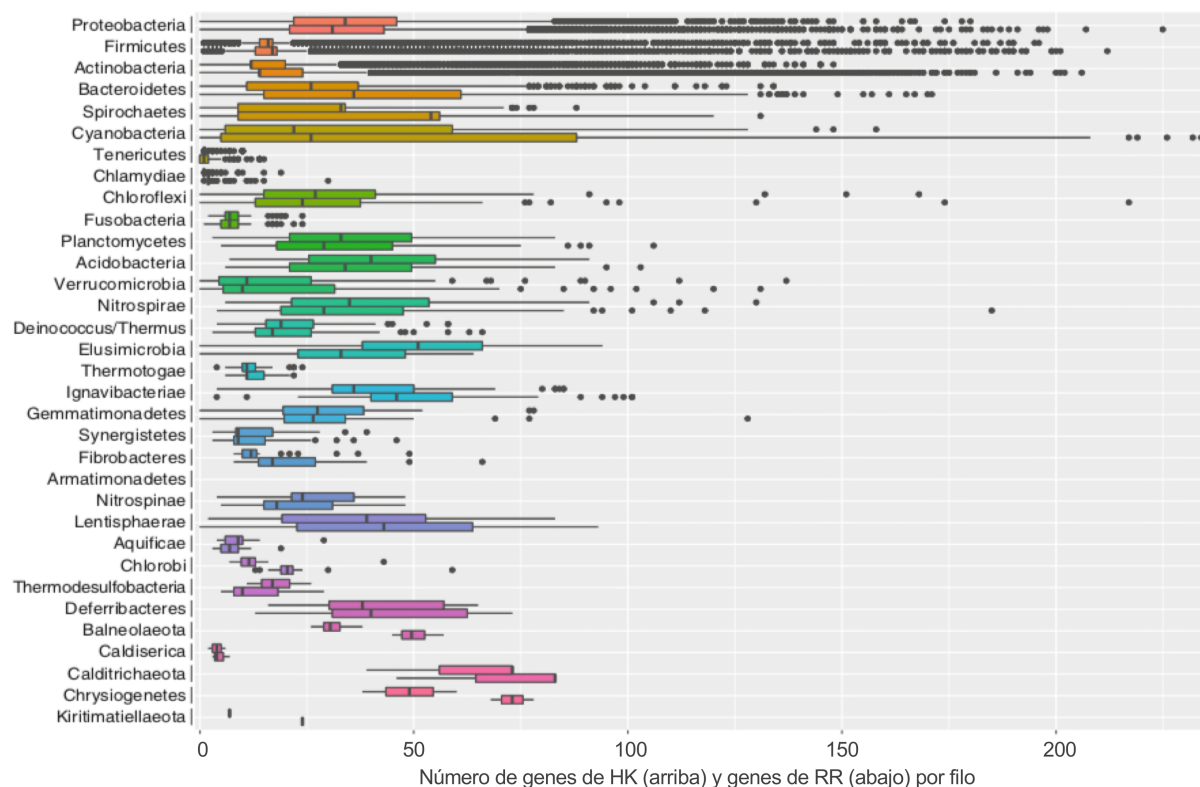
- ◆ Sistemas quimiosensoriales: Representan el grupo más estudiado de sistemas de transducción de señales en bacterias y suponen una versión sofisticada de los sistemas de dos componentes, a los que se suman un componente quimiorreceptor regulado por metilación (MCP, *Methyl-accepting Chemotaxis Protein*), y un adaptador (Wuichet & Zhulin, 2010). La mayoría de estas rutas modulan la quimiotaxis basada en flagelo a través de CheW y el TCS CheAY, pero también otras funciones celulares alternativas como la movilidad por *twitching* basada en pili tipo IV (a través de la ruta ChP) o la formación de *biofilm* (a través de la ruta Wsp) (Corral-Lugo et al., 2016; Persat et al., 2015). En *P. putida* KT2440 se han descrito tres rutas quimiosensoriales ortólogas a Che1, Wsp y Chp de *P. aeruginosa*, pero carece de Che2 que está asociada a virulencia (García-Fontana et al., 2013). Con un total de 27 quimiorreceptores, algunos de los cuales, McpS, McpQ, McpP y McpG, responden ante determinados intermediarios del ciclo de Krebs y aminoácidos (García et al., 2015; Lacal et al., 2010; Martín-Mora et al., 2016; Reyes-Darias et al., 2015).



- ◆ Proteínas serina/treonina/tirosina quinasas (STYK): Son similares a HKs de eucariotas y la mayoría presentan hélices transmembrana capaces de detectar ligandos extracelulares. PknB es relevante en la supervivencia y patogénesis de *Staphylococcus aureus* (Rakette et al., 2012).
- ◆ Sistemas de dos componentes (TCS) son el grupo más abundante e implican una histidina quinasa y un regulador de respuesta (véase más adelante apartado 1.2.).

El análisis de la distribución de histidina quinasas (HK) y reguladores de respuesta (RR) de sistemas de dos componentes en bacterias, ha revelado que: 1) el número de HKs y RRs aumenta ligeramente con el tamaño del genoma y 2) la cantidad de TCSs en los genomas bacterianos se correlaciona con el entorno en el que viven las bacterias de modo que los genomas más grandes requieren más sistemas de transducción de señales, al igual que la vida en el suelo (Galperin et al., 2010; Wassenaar et al., 2018). A diferencia del dominio Arqueas donde el número de HKs y RRs es muy distinto entre especies, especialmente en los metanógenos, los genomas bacterianos normalmente codifican un número similar de ambos componentes (Galperin et al., 2018).

Hoy en día, la mayoría de los genomas bacterianos secuenciados pertenecen a los filos Proteobacterias (45 %), Firmicutes (32 %) y Actinobacteria (12 %), dentro de los cuales existen una variación en el contenido de HKs y RRs especialmente en microorganismos que viven en el suelo (Figura 2) (Wassenaar et al., 2018). La última actualización del censo de proteínas de transducción de señales en procariotas que reúne los datos de 555 genomas secuenciados ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete\\_Genomes/SignalCensus.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html)), marca que la tendencia general es de un número ligeramente superior de RRs que de HKs (Tabla 1). En Proteobacterias, las especies del género *Caulobacter*, *Burkholderia* y *Desulfovibrio*, representantes de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -proteobacterias, presentan mayor variación en el número de HKs y RRs (62-50-64 HKs frente a 45-64-76 RRs, respectivamente), mientras que el número de estas proteínas reguladoras en  $\gamma$ - y  $\epsilon$ -proteobacterias apenas difiere dentro de un mismo organismo (Tabla 1) (Galperin, 2010; Wassenaar et al., 2018).



**Figura 2. Distribución de proteínas de transducción de señales en diferentes filos bacterianos.**

En cajas rectangulares de un mismo color se representan los genes que codifican a histidina quinastas (HK, arriba) y a reguladores de respuesta (RR, abajo) dentro de un determinado filo bacteriano. Los filos fueron ordenados de mayor (arriba) a menor (abajo) según el número de genomas secuenciados (Wassenaar et al., 2018).

En torno al 10 % del genoma de *P. putida* codifica proteínas que participan en la transducción de señales y en la regulación de la expresión génica (Martins dos Santos et al., 2004a). La mayoría de las proteínas de transducción de señales contienen dominios histidina-quinasa (HK) y la mitad de ellas posee actividad sensora. La cantidad de proteínas de transducción de señales se correlaciona en número con los reguladores de respuesta (RR) (Tabla 1). En *Pseudomonas*, la abundancia de proteínas de transducción de señales con respecto a las enterobacterias, les proporciona una enorme versatilidad y capacidad adaptativa (Galperin, 2005, 2010).

**Tabla 1. Distribución de proteínas de transducción de señales en diferentes clases del filo *Proteobacteria*.** HK: histidina quinasa; RR: regulador de respuesta; MCP: proteínas de quimiotaxisceptoras de metilo; STYK: Serina/Treonina/Tirosina quinasa; GGDEF/EAL/HD-GYP: proteínas implicadas en el metabolismo del di-GMP; AC: adenilato ciclasa implicada en el metabolismo del AMP; Total: número de proteínas de traducción de señales (proteínas sensoras + reguladores de respuesta). Modificado de (Galperin et al., 2010).

	Nº total de proteínas	HK	RR	MCP	STYK	GGDEF/EAL/HD-GYP	AC	Total
<b><i>α-Proteobacteria</i></b>								
<i>Agrobacterium</i>	5402	53	58	20	2	29	3	165
<i>Bradyrhizobium</i>	8317	92	96	35	4	42	35	304
<i>Caulobacter crescentus</i>	3737	62	45	18	2	14	3	144
<i>Rhodopseudomonas</i>	4813	66	54	29	5	42	7	203
<b><i>β-Proteobacteria</i></b>								
<i>Bordetella pertussis</i>	3436	18	29	5	3	9	-	64
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	6477	50	64	21	4	26	1	166
<b><i>γ-Proteobacteria</i></b>								
<i>Escherichia coli</i> K12	4242	30	32	5	12	29	1	109
<i>Pseudomonas</i>	5567	63	64	26	8	45	2	208
<i>Pseudomonas putida</i>	5350	67	67	27	5	41	1	208
<i>Salmonella enterica</i>	4758	30	32	6	3	21	1	93
<i>Vibrio cholerae</i>	3835	43	49	45	1	62	1	201
<b><i>δ-Proteobacteria</i></b>								
<i>Desulfococcus</i>	3265	40	56	11	11	28	1	147
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	3531	64	76	28	1	41	1	211
<b><i>ε-Proteobacteria</i></b>								
<i>Helicobacter pylori</i>	1576	4	9	4	1	-	-	18
<i>Wolinella succinogenes</i>	2044	39	48	31	2	26	1	147

Las constantes fluctuaciones en el medio ambiente han supuesto la evolución de rutas de señalización que integran señales extracelulares y las transforman en respuestas rápidas y eficaces permitiendo la supervivencia de las bacterias (Cases, et al., 2003a; Whitworth & Cock, 2009). Dentro de los sistemas de señalización, muchas histidina quinasa pertenecen a sistemas de dos componentes (TCS) naturalmente agrupados en operones que incluyen los genes que codifican a la histidina quinasa y a su regulador de respuesta afín. El hecho de que *P. putida*, en comparación con otras enterobacterias como *E. coli*, posea un número tan elevado de TCS está íntimamente relacionado con la complejidad en el estilo de vida y los

continuos cambios del entorno donde habita. Habitualmente, los microorganismos en nichos estables codifican escasos y primitivos sistemas reguladores, mientras que microorganismos en un medio ambiente de condiciones cambiantes suelen poseer abundantes y sofisticados sistemas de detección y transducción de señales (Galperin, 2005).

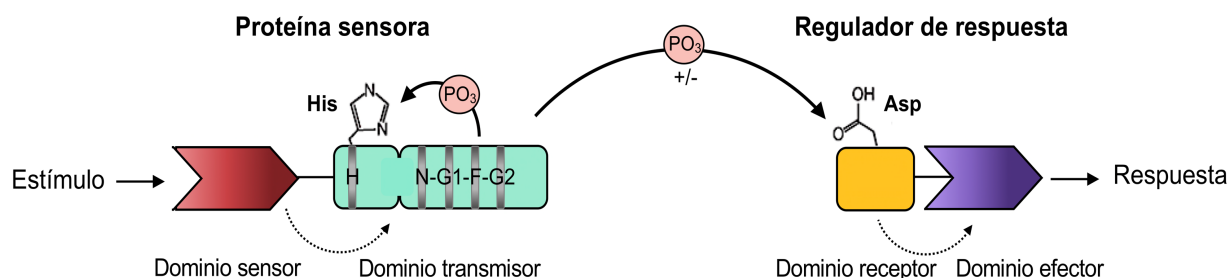
## **1.2. Los sistemas reguladores de dos componentes (TCS)**

La transducción de señales conlleva la conversión de estímulos físicos o químicos en respuestas biológicas generalmente mediante modificaciones en el patrón de expresión génica de un organismo. En bacterias, uno de los principales mecanismos especializados en responder a estímulos externos son los sistemas de dos componentes (TCSs) (Cheung & Hendrickson, 2010; Groisman, 2016; Hoch, 2000; Mascher et al., 2006; Stock et al., 2000). Los sistemas de dos componentes son la familia más grande de vías de transducción de señales en múltiples pasos (Gao & Stock, 2009). Aunque están presentes en los tres dominios de la vida (*Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya*), en bacterias son más abundantes, y se estima que contienen más de una docena de TCS con una arquitectura bastante conservada (Barakat et al., 2011; Salvado et al., 2015). Los TCS suponen un mecanismo de supervivencia que regulan la fisiología bacteriana controlando procesos tales como la quimiotaxis (Kirby, 2009), la formación de *biofilm* (Parsek & Greenberg, 2005), la captación de nutrientes, la respuesta frente a estrés (Eguchi et al., 2011), el metabolismo central (Georgellis et al., 2001) o procesos de virulencia o resistencia a antibióticos (Kleerebezem et al., 1997). De hecho, y ante la necesidad de hallar nuevos medicamentos antimicrobianos, actualmente, se están abordando posibles usos terapéuticos de los sistemas de dos componentes como dianas farmacológicas, dado que la resistencia a muchos antibióticos está regulada por TCSs (Poole, 2012; Tiwari et al., 2017).

### **1.2.1. Sistema de transducción de señales por transferencia de grupos fosforilo**

El prototipo más simple de un sistema de dos componentes en procariotas comprende una proteína sensora (histidina quinasa o HK), que detecta un estímulo medioambiental y provoca un cambio en el estado de fosforilación de un regulador de respuesta citoplásmico (RR). De esta forma, se desencadena una respuesta biológica, que se traduce en un cambio en el patrón de expresión génica, o un cambio en la dirección de rotación del flagelo, como en el caso de los sistemas quimiosensoriales regulados por la proteínas Che (Galperin et al., 2010; Gao et al., 2007; Parkinson, 1993; Parkinson et al., 2015). Los sistemas de señalización

actúan como circuitos en los que intervienen una serie de dominios que monitorizan la entrada y salida de la señal medioambiental (Krell et al., 2010; Mascher, 2014). Por lo general, la proteína sensora contiene un dominio sensor N-terminal variable unido a un dominio transmisor histidina-quinasa conservado mientras que el regulador de respuesta presenta un dominio receptor N-terminal asociado a un dominio efector (Bourret & Silversmith, 2010; Cheung & Hendrickson, 2010; Groisman, 2016) (Figura 3).



**Figura 3. Esquema del prototipo de sistema de dos componentes bacteriano.** La información del estímulo detectado fluye a través de los dominios (flechas discontinuas) y mediante reacciones de transferencia de grupos fosforilo (flechas continuas) desde el residuo de histidina (His) y aspártico (Asp) conservados. Las vías por las cuales la proteína sensora puede controlar al regulador de respuesta se representan con signos + (actividad quinasa) y – (actividad fosfatasa). En el dominio transmisor se indican los motivos conservados denominados cajas H, N, G1, F y G2.

Estos sistemas de señalización conforman un mecanismo modular versátil controlado por reacciones de transferencia de grupos fosforilos donde el módulo transmisor de la proteína sensora puede controlar la actividad del elemento regulador positiva (actividad quinasa) o negativamente (actividad fosfatasa). En un control positivo se produce la autofosforilación de un residuo de histidina conservado en la proteína sensora en una reacción reversible, generando un intermediario de alta energía, que a su vez transfiere el grupo fosforilo a un residuo de aspártico del regulador de respuesta (Hess et al., 1988; Ninfa & Bennett, 1991; Sanders et al., 1992). Por otra parte, en un control negativo tiene lugar la desfosforilación del dominio receptor del RR afín, como consecuencia de la actividad fosfatasa de la proteína sensora, devolviendo al sistema al estado previo al estímulo (Ninfa & Magasanik, 1986; Song et al., 2004). Este control negativo es crítico, por ejemplo, en procesos como la regulación de la virulencia o la resistencia antibiótica en *Salmonella entérica* o *E. coli*. (Chamnongpol et al., 2003; Kostakioti et al., 2009). Por ello, es esencial un preciso balance entre los procesos de fosforilación y desfosforilación del RR, para generar una respuesta ajustada (Gao & Stock, 2009; West & Stock, 2001).

Además, se han descrito sistemas de dos componentes más complejos con una histidina quinasa híbrida, con un residuo de aspártico conservado en un dominio C-terminal adicional, en los que la fosfotransferencia al RR ocurre en varias reacciones consecutivas. En este caso interviene también una histidina fosfotransferasa (HPT):  $\text{His}^1 \rightarrow \text{Asp}^1 \rightarrow \text{His}^2 \rightarrow \text{Asp}^2$  (Figura 4 B) (Hoch, 2000; Krell et al., 2010). Asimismo, se han identificado proteínas auxiliares encargadas de transmitir la señal a la proteína sensora, como fosfatasas específicas del RR y otros elementos que complementan el sistema (Atkinson & Ninfa, 1998; Hazelbauer & Lai, 2010; Silversmith, 2010). Un ejemplo es la HK CheA en *E. coli*, que se acopla al quimiorreceptor de membrana Tar a través de la proteína de acoplamiento CheW. Los quimiorreceptores detectan las condiciones nutricionales del medio y transmiten la información a CheA, que finalmente promueve el *swimming* mediante movilidad flagelar hacia zonas con mayor concentración en nutrientes (Parkinson et al., 2015; Sourjik & Wingreen, 2012; Wadhams & Armitage, 2004).

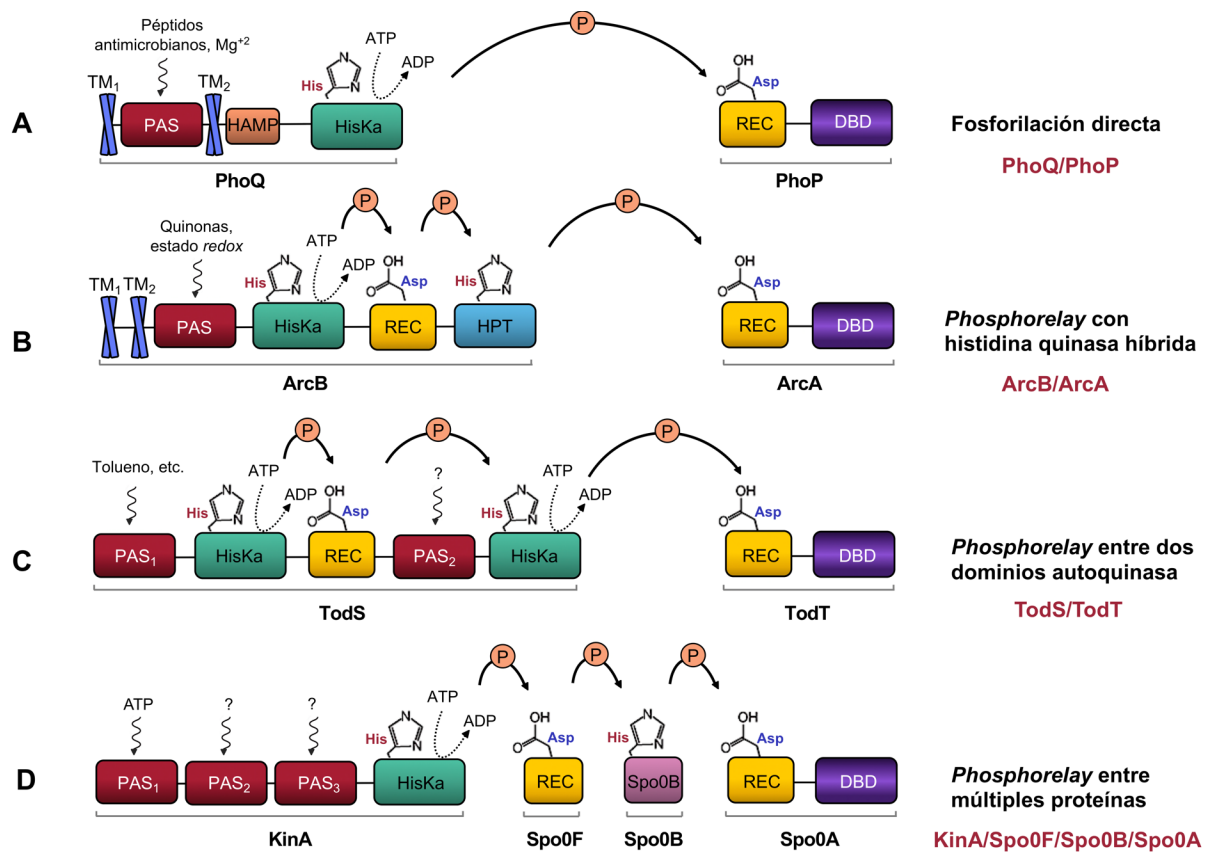
Por otra parte, los microorganismos están expuestos constantemente a diferentes gradientes de estímulos ambientales lo que refuerza la hipótesis de que varios sistemas de dos componentes estén interconectados. Estudios recientes han postulado que los sistemas de señalización celular reflejan una elevada complejidad, dada la variedad de componentes que intervienen y sus interconexiones con otros sistemas reguladores a través de mecanismos de retroalimentación, comunicación cruzada o *crosstalk* (Eguchi et al., 2011; Olivera et al., 2010). Tal es el caso de la proteína PmrD que conecta los TCSs PhoQ/PhoP y PmrB/PmrA en *Salmonella entérica* (Kato & Groisman, 2004; Kox et al., 2000) o de la proteína de membrana SafA que conecta EvgS/EvgA con PhoQ/PhoP en *E. coli* (Eguchi et al., 2007; Ishii et al., 2013).

### 1.2.2. Proteínas sensoras en los TCS

Las histidina quinastas (HKs) representan una amplia familia de proteínas implicadas en la transducción de señales caracterizadas por su diversidad en su arquitectura. Suelen ser proteínas sensoras integradas en membrana que presentan actividad quinasa mediante la cual transfiere el grupo fosforilo desde la molécula donadora, ATP, hasta un residuo de histidina único que reside en el dominio catalítico de unión a ATP. El dominio catalítico (CA) junto al dominio de dimerización y fosfotransferencia (DHp) conforman el núcleo quinasa.

Los mecanismos de transferencia de grupos fosforilos desde histidina quinasa hasta reguladores de respuesta han sido profundamente estudiados y pueden ser:

- Fosforilación directa en el dominio autoquinasa de HK y su transferencia inmediata al dominio receptor del RR, tipo PhoQ/PhoP (Figura 4 A).
- Phosphorelay* o concatenación de múltiples reacciones de fosforilación. Por lo general, involucra cuatro eventos secuenciales de fosfotransferencia ( $\text{His}_1 \rightarrow \text{Asp}_1 \rightarrow \text{His}_2 \rightarrow \text{Asp}_2$ ) que pueden ocurrir dentro de dominios individuales de una proteína dada (tipo ArcB/ArcA o tipo TodS/TodT) (Figura 4 B y C) y/o entre varias proteínas independientes (tipo KinA/Spo0F/Spo0B/Spo0A) (Figura 4 D) (García Vescovi et al., 2010; Krell et al., 2010; Wuichet et al., 2010).

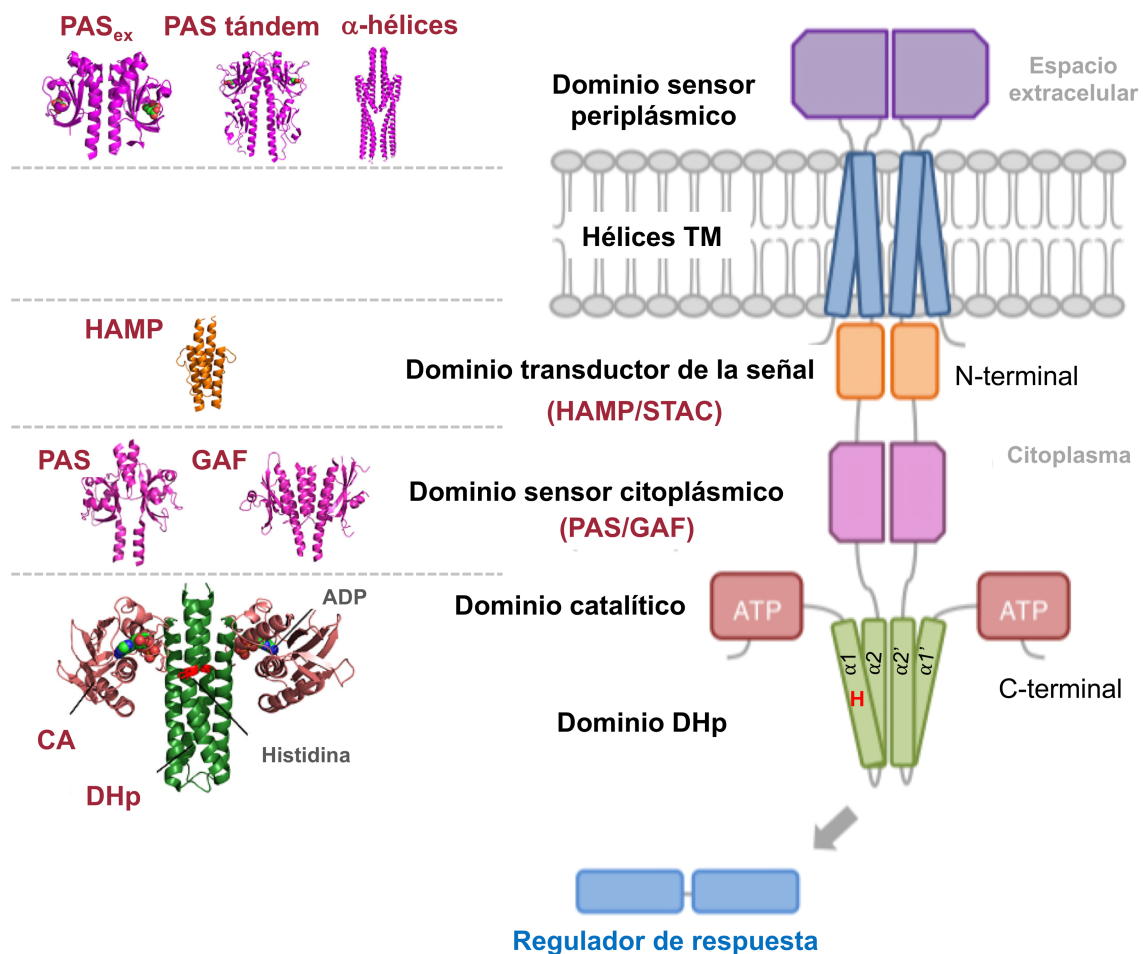


**Figura 4. Mecanismos de fosforilación entre histidina quinasa y su regulador de respuesta.** Se representa los diferentes métodos de fosforilación entre las HKs y los RRs. Puede ocurrir por fosforilación directa tipo PhoQ/PhoP (A), la transferencia de grupos fosforilos (P) entre un dominio autoquinasa (HisKA), un dominio receptor (REC) interno y un dominio de fosfotransferencia (HPT) tipo ArcB/ArcA (B), o intervienen dos dominios HisKA tipo TodS/TodT (C) o la presencia de varias proteínas independientes tipo KinA/Spo0F/Spo0B/Spo0A (D). TM: Dominios transmembrana, PAS: Dominio Per-ArNT-Sim, HAMP: Dominio Histidine kinase, Adenylyl cyclase, Methyl-accepting protein and Phosphatase, DBD: Dominio de unión a ADN (DNA Binding Domain). Adaptado de (Krell et al., 2010).

### 1.2.2.1. Clasificación estructural de HKs

Las proteínas sensoras de los TCS suelen tener una organización modular de dominios conservados (K. Jung et al., 2012) en distintas configuraciones que generan una gran variabilidad en su organización topológica (Gao & Stock, 2009). Esta peculiaridad proporciona una sorprendente evolución con la constante adquisición de nuevas propiedades funcionales. El surgimiento de nuevos TCSs se debe, en gran medida, a la duplicación de genes y la combinación de dominios estructurales. Más del 70 % de las histidina quinasas duplicadas tienen dominios sensores completamente diferentes a sus parálogos más cercanos, lo que sugiere la combinación aleatoria de dominios con el fin de dotar a las bacterias de la capacidad de responder a una gama más amplia de estímulos ambientales (Alm et al., 2006; Capra & Laub, 2012).

La mayoría de las histidina quinasas son proteínas transmembrana y contienen frecuentemente dos grandes dominios funcionales: un dominio de entrada o sensor y un dominio transmisor o catalítico (Cheung & Hendrickson, 2010; Zschiedrich et al., 2016).





**Figura 5. Arquitectura de dominios en proteínas histidina quinasa en sistemas de dos componentes.** A la izquierda, los diferentes tipos de dominios sensores [extracitoplásmicos (PAS<sub>ex</sub> PAS en tándem y  $\alpha$ -hélices o helicoidal)], transmembrana (TM) y citoplásmicos (PAS y GAF)), los dominios responsables de la detección y transducción de la señal (HAMP y STAC) y los dominios de catalítico de unión a ATP (CA) y de dimerización (DHp). A la derecha, se esquematiza la localización celular de la estructura modular de una histidina quinasa y de su correspondiente regulador de respuesta. Los ligandos se indican mediante esferas verde y roja, H representa el residuo conservado de histidina y  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  las hélices homodiméricas del dominio DHp. Para representar los dominios de las HKs se emplearon las siguientes ID de PDB (CitA: 2J80 para PAS<sub>ex</sub>; KinD: 4JGO para PAS en tándem; TorS: 3O1H para  $\alpha$ -hélices; Af1503: 2L7H para HAMP; NifA: 4G3K y CovS: 4I5S para GAF y PAS, respectivamente; HK853: 3DGE para los dominios CA y DHp). Modificado de (Zschiedrich et al., 2016).

#### 1.2.2.1.1. Dominios sensores de HKs

Se han descrito más de 14 tipos de dominios sensores en las HK y están presentes en todos los Dominios de la vida, percibiendo una extensa gama de estímulos. Los dominios **PAS** (Per-ARNT-Sim) y los dominios **GAF** (cGMP phosphodiesterase-Adenylyl cyclase-FhlA) son los mas abundantes, y constituyen las superfamilias más grandes de módulos sensores (Figura 5).

- a. Dominios **PAS**: Tienen una conservación en la secuencia de aminoácidos muy baja, lo que dificulta su anotación en las bases de datos, pero generalmente adoptan una estructura conservada formando un núcleo de láminas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por  $\alpha$ -hélices (Möglich et al., 2009; Vreede et al., 2003). Originalmente, los dominios PAS se descubrieron como sensores intracelulares con regiones homólogas de 50 aminoácidos a las proteínas Per, ARNT y Sim (de ahí su nombre) (Nambu et al., 1991; Ponting & Aravind, 1997; Zhulin et al., 1997). Sin embargo, recientes estudios han mostrado que adoptan un solo pliegue globular de 100 aminoácidos aproximadamente (Hefti et al., 2004). Además, se han identificado varios elementos extracitoplásmicos como los dominios PDC (PhoQ, DcuS, CitA) (Cheung et al., 2008), Cache (Anantharaman & Arvind, 2000) y el dominio con actividad fotoquímica LOV (Light-Oxygen-Voltage), que son el resultado de la disposición en tándem de dos dominios PAS (Crosson et al., 2003). Los ligandos funcionales asociados a los dominios PAS suelen ser grupos hemo (tipo c o tipo b), flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), ácido 4-hidroxicinámico o ácido *p*-cumárico, ácidos carboxílicos C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> (malonato, malato y succinato), ácidos carboxílicos C<sub>6</sub> (citrato), cationes

metálicos divalentes y ciertos ácidos grasos (Henry & Crosson, 2011; Taylor & Zhulin, 1999).

- b. Dominios **GAF**: Son dominios de unión a nucleótidos cíclicos (NMPc) como di-GMPc o AMPc que regulan la actividad catalítica de la mayoría de fosfodiesterasas y de adenilato ciclasas. Comparten estructura tridimensional con los dominios PAS sugiriendo un posible origen evolutivo común (Anantharaman et al., 2001; Ho et al., 2000; Ponting & Aravind, 1997).
- c. Dominios **TM** (*Transmembrane domains*): Aunque los dominios TM de las HKs son necesarios para el anclaje en la membrana, y así convertir y transmitir la señal extracelular detectada por el dominio sensor extracelular hasta el dominio catalítico intracelular, en algunos casos se les atribuyen también funciones sensoriales. Tal es el caso de estímulos relacionados con el estrés en la membrana, en los que son capaces de detectar directamente la señal.

Los dominios sensores presentan una estructura particularmente diversa y los mecanismos por los cuales interactúan con los dominios histidina-quinasa son desconocidos (Bhate et al., 2015). No obstante, la construcción de quimeras ha demostrado ser una herramienta útil para caracterizar estructural y funcionalmente los sistemas de dos componentes (Capra & Laub, 2012; Ganesh et al., 2013; Mondéjar et al., 2012; Sepulveda & Lupas, 2017; Skerker et al., 2008; Utsumi et al., 1989).

#### 1.2.2.1.2. Dominios transductores de HKs

Los dominios transductores acoplan los dominios sensoriales y catalíticos para una correcta transducción del estímulo, durante el proceso de conversión de señales ambientales en respuesta celulares. De este modo, la señal sensorial se transmite al dominio transmisor que a su vez modula la actividad del dominio de salida (catalítico) de la histidina quinasa. Muchas HKs y quimiorreceptores contienen uno o varios de estos dominios que representan extensiones directas de los elementos transmembrana (Zschiedrich et al., 2016). En la mayoría de los casos, la eliminación de los dominios transmisores interrumpe la conexión entre los motivos de entrada y salida, originando receptores incapaces de modificar su actividad tras la recepción de la señal (Hazelbauer et al., 2008).

El más estudiado es el dominio **HAMP** (*Histidine kinase*, *Adenylyl cyclase*, *Methyl-accepting protein and Phosphatase*) denominado así por su presencia en histidina quinasas, adenilato ciclasas, quimiorreceptores y fosfatasa (Figura 5). Constituye una región en espiral

de aproximadamente 50 aminoácidos y desempeña un papel esencial en la transferencia de la señal extracelular en HKs transmembrana. No obstante, aún se desconoce por qué algunas HKs requieren de este dominio para su correcto funcionamiento y otras no (Dunin-Horkawicz & Lupas, 2010; Parkinson, 2010).

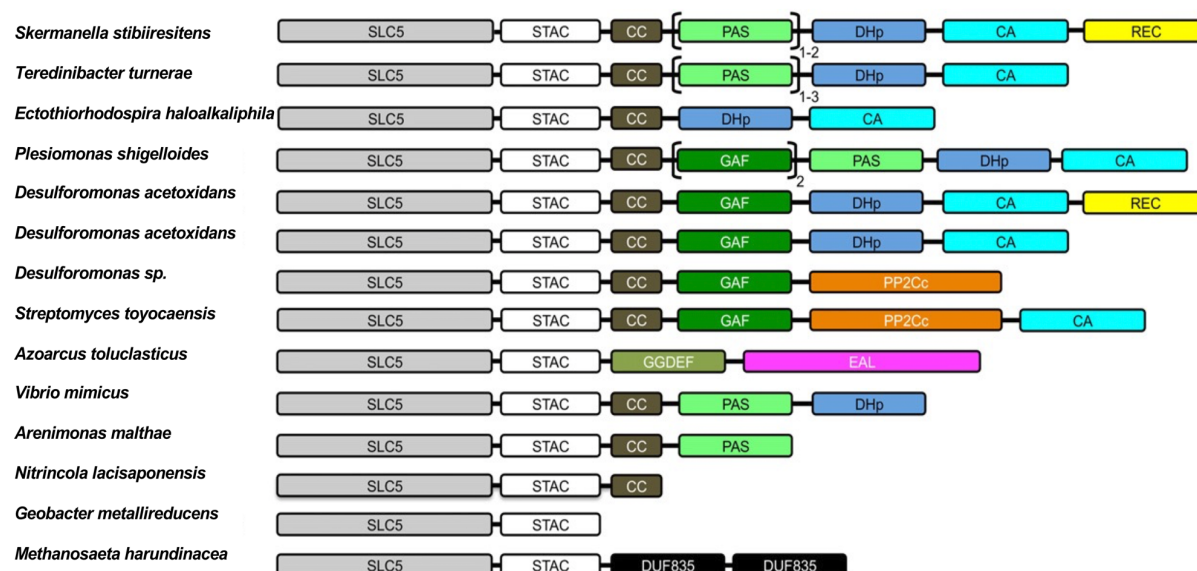
Los dominios **STAC** (*Solute carrier 5 (SLC)-Two component signal transduction Associated Component*) tienen una localización similar al dominio HAMP (Figura 5). Sin embargo, a diferencia del dominio HAMP, conecta una región multitransmembrana particular, identificada como transportador de soluto 5 (SLC5), cuya estructura se asemeja a cotransportadores  $\text{Na}^+$ /soluto, a una región en espiral cuya función aún se desconoce. Su función no está del todo clara, pero se especula que podría ser un sitio de entrada del estímulo como los dominios PAS o GAF, un modulador que transmite la señal entre dominios adyacentes, interaccionar con módulos de otras proteínas o regular el flujo de sustratos a través de las regiones TM. Este tipo de dominio se ha descrito recientemente en las HKs CbrA y CrbS de *Pseudomonas* (Korycinski et al., 2015; Sepulveda & Lupas, 2017; Zhang & Rainey, 2008).

#### 1.2.2.1.3. Dominios catalíticos de HKs

La región citoplásmica de las HKs tiene una alta conservación en la secuencia de aminoácidos, y comprende los dominios de dimerización y fosfotransferencia (**DHp**) y el catalítico de unión a ATP (**CA**) (Figura 5). En el dominio de fosfotransferencia, DHp (*Dimerization and Histidine phosphotransfer domain*), ocurren tres reacciones catalíticas: la autofosforilación en un residuo de histidina conservado, la transferencia del grupo fosforilo al RR y, en ciertas HKs bifuncionales, una reacción fosfatasa (Bhate et al., 2015). En su estructura se aprecia un paquete de cuatro hélices antiparalelas homodiméricas con dos largas hélices conectadas ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), donde  $\alpha 1$  (caja H) presenta el residuo de histidina susceptible de ser fosforilado (Marina et al., 2005; Mascher et al., 2006; Stock et al., 2000; Zschiedrich et al., 2016) (Figura 5). El dominio catalítico, CA (*Catalytic ATP-binding domain*) es reconocible por un conjunto de motivos conservados denominados cajas N, G1, F y G2, esenciales en la unión de  $\text{Mg}^{+2}$  y ATP (Bilwes et al., 2001; Marina et al., 2001; Parkinson & Kofoed, 1992). Las cajas G1 y G2 se asemejan a dominios de unión de nucleótidos ricos en glicina y están separadas por un espaciador de composición y longitud variable con el bloque F situándose entre ambas (Rossmann et al., 1974). En HKs canónicas, los dominios DHp y CA están conectados por un lazo corto y flexible de 5-10 residuos, y constituyen el núcleo

quinasa donde el proceso de autofosforilación tiene lugar cuando el ATP unido al dominio CA transfiere el grupo fosforilo al residuo de histidina conservado en DHp.

En definitiva, la combinación de los diversos dominios anteriormente descritos hace que la arquitectura modular de las histidina quinasa sea tan extensa (Figura 6), y conlleva la gran versatilidad adaptativa que caracteriza a las bacterias de este género.



**Figura 6. Arquitectura modular de histidina quinasa con dominio SLC5 en diferentes organismos.** Se esquematizan los siguientes dominios: SLC5, dominio de la familia de transportadores de soluto; STAC, dominio asociado a transportadores SLC5 de sistemas de traducción de señales; CC, hélice superenrollada; PAS y GAF, dominios de unión a ligando del pliegue de profilina; DHp, dominio de dimerización y fosfotransferencia; CA, dominio catalítico de unión a ATP; REC, dominio receptor en reguladores de respuesta; PP2Cc, proteína fosfatasa; GGDEF, diguanilato ciclasa (producción de c-di-GMP); EAL, dominio fosfodiesterasa (degradación de c-di-GMP); DUF835, dominio de función desconocida. Adaptado de (Korycinski et al., 2015).

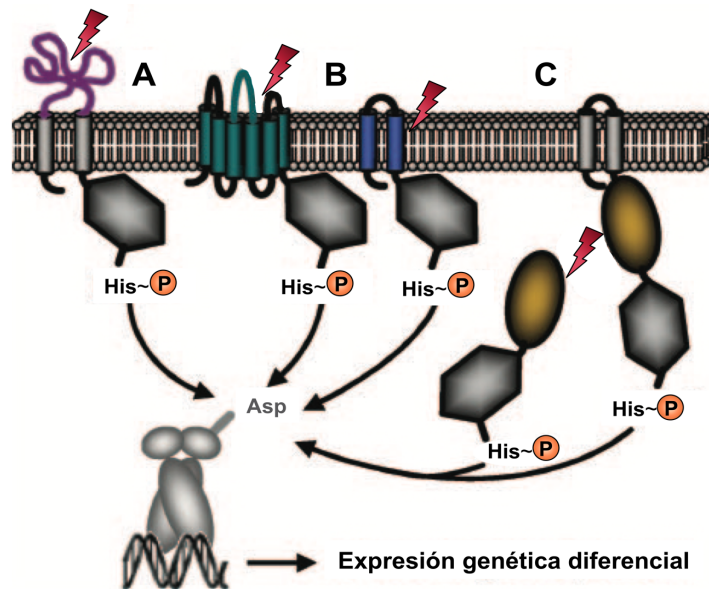
#### 1.2.2.2. Clasificación de HKs en función de la topología

Atendiendo a la localización y al mecanismo de detección y transducción de los estímulos (Mascher et al., 2006), las HKs pueden ser clasificadas en tres grupos:

- HKs extracelulares o de detección periplásmica: Contienen un dominio sensor extracelular que detecta solutos o nutrientes flanqueado por al menos dos hélices TM. La separación del dominio sensor y el dominio quinasa en dos compartimentos celulares distintos requiere, por tanto, la transducción de la señal a través de los

dominios TM. Esta topología es típica de HKs que detectan solutos o nutrientes como EnvZ, PhoQ o PrrB (Mascher et al., 2006) (Figura 7, Tabla 2).

- b. HKs transmembrana: La detección de la señal está vinculada a regiones transmembrana que abarcan de 2 a 20 hélices TM. Estas regiones TM están interconectadas por uniones intra- o extracelulares bastante cortas de modo que el dominio sensor, si lo tienen, no es muy evidente en este tipo de HK. La recepción del estímulo puede ocurrir en la región transmembrana en combinación con lazos cortos extracelulares o únicamente por medio de las hélices TM. Algunos estímulos están relacionados con las propiedades mecánicas de la envoltura celular (turgencia o estrés mecánico) mientras que otros estímulos implican gradientes iónicos o electroquímicos, presencia de compuestos que alteran la integridad de la membrana, procesos de transporte o *quorum sensing*. Ejemplos de esta clase de HKs son DesK, RegB y ComD (Mascher et al., 2006) (Figura 7, Tabla 2).
- c. HKs citoplásmicas. La señal detectada es intracelular y a menudo son solutos citoplásmicos, proteínas que informan del estado metabólico de la célula, estímulos difusibles o internos como O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub> o señales transmitidas por sensores TM. Esta categoría engloba HKs ancladas a membrana tales como FixL o KdpD, o completamente solubles como NtrB (Mascher et al., 2006) (Figura 7, Tabla 2).



**Figura 7. Mecanismo de recepción de la señal en histidina quinazas.** **A.** HKs sensoras periplásmicas. **B.** HKs con mecanismos sensores en la región transmembrana. **C.** HKs sensoras citoplásmicas solubles o ancladas a la membrana. El grupo fosforilo y el estímulo se representan con un círculo naranja y un rayo rojo, respectivamente. Las partes de las proteínas involucradas en la recepción del estímulo aparecen coloreadas. Modificado de (Mascher et al., 2006).

### 1.2.2.3. Clasificación de HKs en función de la naturaleza de la señal

La enorme diversidad de señales ambientales y la constante evolución de su percepción a través de múltiples mecanismos celulares dificulta la identificación de esas señales reguladoras de los sistemas de dos componentes por lo que se han identificado relativamente pocas de ellas (Krell, 2015; Martín-Mora et al., 2018). La señal puede ser detectada por interacción directa con la proteína sensora mediante un dominio específico (*Ligand Binding Domain*, LBD) o bien a través de otras proteínas accesorias.

Si el dominio que detecta la señal es el dominio PAS, la señal puede interaccionar con éste de diversas formas (Krell et al., 2010):

- a. Unión de la señal a la cavidad del dominio PAS con diferentes grados de especificidad. Ejemplo: CitA/CitB que regula la expresión de genes de fermentación de citrato bajo condiciones anóxicas (Bott et al., 1995) (Tabla 2).
- b. Detección de la señal a través de un dominio PAS asociado a cofactores como flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) o grupo hemo tipo b o c unidos a su cavidad central. Ejemplos: FixL contiene un grupo hemo que posibilita la unión al oxígeno o MmoS cuyo dominio PAS se une a FAD con el cual detecta el potencial *redox* celular (Key et al., 2007b; Ukaegbu & Rosenzweig, 2009) (Tabla 2).
- c. Detección de la señal a través de un dominio PAS periplásmico. Un ejemplo es PhoQ cuya interacción proteína-membrana está mediado por iones metálicos. Determinados péptidos antimicrobianos desplazarían los iones metálicos unidos y liberarían el dominio PAS estimulando de este modo la actividad quinasa de PhoQ (Bader et al., 2005) (Tabla 2).
- d. La señal puede modular el estado oligomérico de la HK a través de la formación de enlaces disulfuro. Ejemplo: TCS ArcA/ArcB, donde ArcB alcanza su máximo nivel de actividad quinasa cuando dos residuos de cisteína, ubicados en su dominio PAS, son reducidos a través de la formación de enlaces disulfuros catalizados por quinonas (Malpica et al., 2004) (Tabla 2).

Por otra parte, si la detección de la señal se realiza a través de regiones transmembrana (TM), es probable que no sea una molécula en particular la que desencadene la respuesta, sino determinadas alteraciones en la membrana ocasionados por factores como la temperatura o un cambio en la disposición lipídica, como en el caso de DesK (Cybulski et al., 2004) (Tabla 2). Además, las bacterias han desarrollado mecanismos en los que la señal no interactúa directamente con una HK sino que se transmite a través de una proteína accesorias.

Este mecanismo se denomina sistema de tres componentes y el creciente número de informes sugiere que dichos sistemas son más frecuentes de lo previsto inicialmente. Las proteínas accesorias incluyen proteínas de quimiotaxis que aceptan grupos metilo (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*, MCP) con regiones transmembrana y un LBD (Tar para CheA), una proteína accesorio citosólica (PII para la histidina quinasa NtrB) o una proteína accesorio periplásmica (LuxP para LuxQ) (Krell et al., 2010) (Tabla 2).

La información recabada en la bibliografía sobre histidina quinasas sugiere que, aun compartiendo la misma topología y organización modular, tanto el mecanismo sensorial como la naturaleza de la señal son completamente diversos y difíciles de predecir. En la tabla 2, se muestra una breve selección de histidina quinasas cuya función está íntimamente relacionada con el metabolismo, la adaptación a cambios ambientales, la captación de nutrientes y la virulencia. La mayoría de las HKs de la tabla 2 contienen dominios PAS periplásmicos del tipo helicoidal o PDC y, en menor medida, del tipo LOV con actividad fotoquímica representado por la HK LovK. ArsS es el paradigma de HKs con dominio PAS periplásmico helicoidal que le proporciona una ventaja adaptativa a *Helicobacter pylori* para la colonización de ambientes extremadamente ácidos como el estómago (Tabla 2). Aparte de las HKs en cuyos dominios PAS reside la función sensora, es destacable otras HKs con dominios GAF quizás menos conocidas como DosS/DevS o KdpD que responden ante condiciones de hipoxia o concentración de iones esenciales como  $K^+$ , respectivamente (Tabla 2). En otras HKs la función sensora radica en sus dominios TM a través de los cuales detectan fluctuaciones de temperatura (DesK), tensión de oxígeno (RegB) o incluso densidad celular (ComD).

**Tabla 2. Selección de algunas histidina quinastas pertenecientes a TCS con señales caracterizadas.** Con \* se indican los dominios sensores presumibles de determinadas HKs. Entre corchetes se indica la proteína accesoria necesaria para la actividad de la histidina quinasa.

HK	Función	Señal	Dominio	Referencia
<b>Metabolismo</b>				
ArcB	Metabolismo aeróbico Adaptación a cambios en la tensión de O <sub>2</sub>	Estado <i>redox</i> de quinonas	PAS	(Georgellis et al., 2001; Malpica et al., 2004)
CitA	Transporte y metabolismo anaeróbico del citrato	Citrato	PDC	(Kaspar et al., 1999; Sevvana et al., 2008)
NarX	Respiración nitrato/nitrito	Nitrato/nitrito	Periplásmico helicoidal	(Cheung & Hendrickson, 2009; Lee et al., 1999)
DesK	Fluidez de membrana. Síntesis de peptidoglicano	Temperatura	TM	(Albanesi et al., 2009; Martin et al., 2009)
TodS	Degradación de derivados del benceno	Tolueno, o-xileno	PAS	(Busch et al., 2007; Silva-Jiménez et al., 2015)
DcuS	Respiración anaerobia del fumarato	Dicarboxilatos C <sub>4</sub> (fumarato, succinato, malato, tartrato)	PDC	(Cheung & Hendrickson, 2008)
AccS	Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	Estado <i>redox</i> de quinonas	PAS	(Valderrama et al., 2019)
MmoS	Regulación mediada por cobre de la monooxigenasa soluble de metano	Estado <i>redox</i>	PAS	(Ukaegbu & Rosenzweig, 2009)
TorS [TorT]	Respiración anaerobia	Trimetilamina-N-óxido (TMAO)	Periplásmico helicoidal	(Moore & Hendrickson, 2009)
<b>Adaptación a cambios ambientales</b>				
EnvZ	Osmoregulación	Presión osmótica	Periplásmico*	(Cai & Inouye, 2002; Foo et al., 2015)
DosS, DevS	Supervivencia en ambientes de hipoxia	Limitación de O <sub>2</sub> , CO y NO	GAF	(Cho et al., 2009; Podust et al., 2008)
ComD	Competencia genética. Tolerancia a estrés oxidativo. Resistencia a antibióticos. Formación de <i>biofilm</i>	Péptido estimulante de la competencia (CSP)	TM	(Pestova et al., 1996; Zu et al., 2019)
ArsS	Colonización de ambientes ácidos. Ureasa	pH ácido	Periplásmico*	(Muller et al., 2009; Pflock et al., 2004)
EvgS	Resistencia a ambientes ácidos. Biosíntesis de polisacáridos.	pH ligeramente ácido combinado con Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	PAS*	(Itou et al., 2009)
LuxQ [LuxP]	<i>Quorum sensing</i>	Densidad celular, Autoinductor-2	PDC	(Neiditch et al., 2006)
LovK	Adhesión celular	Luz visible	LOV	(Purcell et al., 2007)

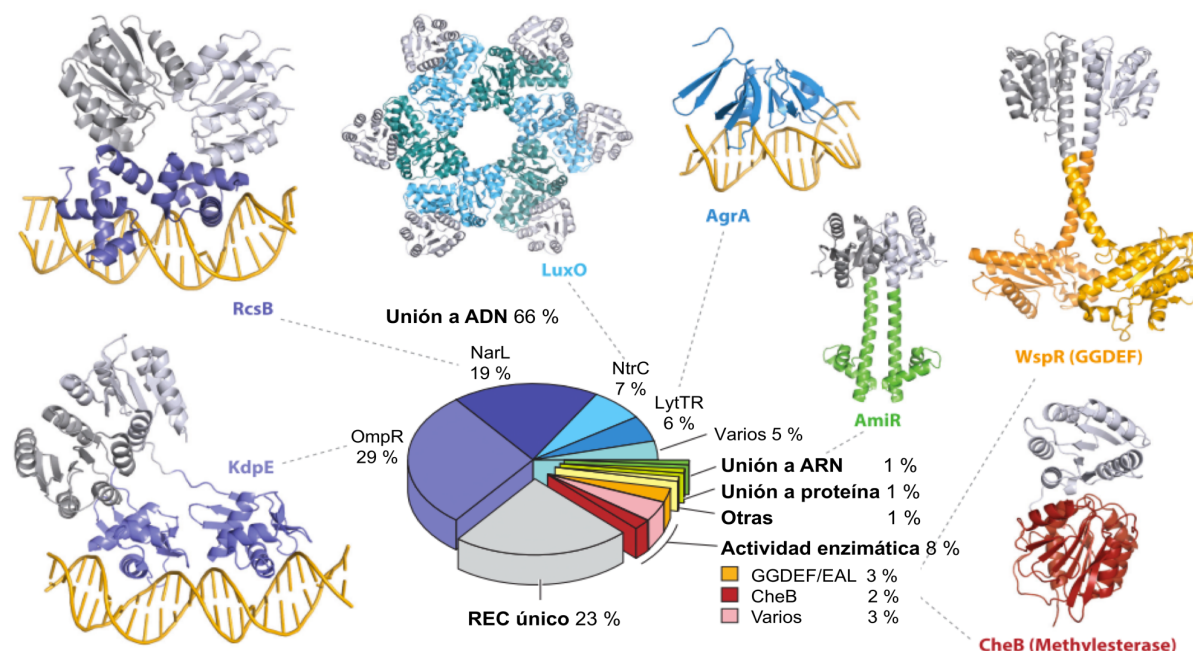


VanS	Resistencia antibióticos	Vacomicina	Periplásmico*	(Hutchings et al., 2006; Koteva et al., 2010)
PmrB	Modificación lipopolisacáridos (LPS). Homeostasis del hierro. Resistencia a polimicina B	Fe <sup>+3</sup> y Al <sup>+3</sup> extracelular, pH ligeramente ácido	Periplásmico	(Perez & Groisman, 2007; Wösten et al., 2000)
RegB	Adaptación a cambios en la tensión de O <sub>2</sub>	Estado <i>redox</i> ubiquinona y citocromo oxidasa cbb <sub>3</sub>	TM	(Swem et al., 2006; J. Wu et al., 2013)
CpxA [CpxP]	Respuesta a estrés en la envoltura celular	Estrés en la pared celular (pH alcalino, NaCl, adhesión a superficies hidrofóbicas, mal plegamiento de proteínas...)	Periplásmico	(Hunke et al., 2012; Martinez et al., 2016)
KdpD	Homeostasis intracelular de K <sup>+</sup>	Limitación de K <sup>+</sup> , fuerza iónica, niveles intracelulares de ATP	GAF	(Heermann & Jung, 2010)
<b>Captación de nutrientes</b>				
FixL	Fijación de nitrógeno (N <sub>2</sub> )	O <sub>2</sub> , CO y NO	PAS	(Key et al., 2007b)
NtrB	Asimilación de nitrógeno	2-oxoglutarato/glutamina	PAS*	(Jiang & Ninfa, 2009; Schumacher et al., 2013)
PhoR [Pst/PhoU]	Asimilación de fósforo	Limitación de fósforo inorgánico (Pi)	PAS	(Hsieh & Wanner, 2010; Makino et al., 1989; Shi & Hulett, 1999)
DctB	Captación de dicarboxilatos C <sub>4</sub>	Dicarboxilatos C <sub>4</sub>	Doble PDC	(Zhou et al., 2008)
<b>Virulencia</b>				
BvgS	Virulencia, formación de <i>biofilm</i>	Temperatura, SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , ácido nicotínico, estado <i>redox</i> de quinonas	PAS	(Beier & Gross, 2006; Mishra et al., 2005)
PhoQ	Adaptación a ambientes ácidos. Virulencia	Péptidos antimicrobianos, baja concentración de Mg <sup>+2</sup> , pH ácido	PDC	(Ishii et al., 2013; Wang et al., 2017)
RetS	Virulencia mediante los sistemas de secreción tipo III y VI. Formación de <i>biofilm</i>	Carbohidrato*	Periplásmico (Sándwich β)	(Jing et al., 2010; Laskowski & Kazmierczak, 2006)

### 1.2.3. Elementos reguladores de respuesta (RR)

El regulador de respuesta (RR) de los sistemas de dos componentes es el elemento clave para ejecutar una respuesta celular específica atendiendo al estímulo detectado por la histidina quinasa. Un aspecto común de los reguladores de respuesta es el dominio fosforeceptor tipo CheY (dominio REC), que recibe el grupo fosforilo procedente de la histidina quinasa. Aunque existen reguladores de respuesta de un solo dominio, la mayoría contienen

un dominio efector asociado de elevada variabilidad (Figura 8). La superfamilia de RRs se divide en cinco clases basándose en el modo en el que el dominio efector ejerce su respuesta. Estas clases corresponden a RRs de unión a ADN (66 %), de unión a ARN (1 %), con actividad enzimática (8 %), de unión a proteínas (1 %) y de un solo dominio (23 %) (Figura 8).



**Figura 8. Clasificación de la superfamilia de reguladores de respuestas en bacterias.** El gráfico circular representa la distribución porcentual de las principales clases y subclases de RRs. Los porcentajes de las correspondientes subclases dentro de cada grupo de RR se indican con barras horizontales y las estructuras de sus miembros más representativos en diagramas de cintas (el dominio REC en gris y el dominio efector en color). Para presentar los dominios efectores de los RRs se emplearon las siguientes ID de PDB (KdpE: 4KNY, RcsB: 5W43, LuxO: 5EP0, AgrA: 3BS1, AmiR: 1QO0, WspR: 3BRE, CheB: 1A2O). Adaptado de (Gao et al., 2019).

Aproximadamente el 70 % de los dominios efectores en los RR son dominios de unión a ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), que se clasifican en cuatro subfamilias denominadas tipo- OmpR, NarL/LuxR, NtrC y LytR (Gao et al., 2019; Gao & Stock, 2009; Zschiedrich et al., 2016) (Figura 8). Los dominios de unión a ADN más abundantes son del tipo hélice-giro-hélice (HTH, *Helix-Turn-Helix*) o de tipo alado wHTH (*winged HTH*), representados en las subfamilias más grandes NarL y OmpR, respectivamente (Baikalov et al., 1996; Martínez-Hackert & Stock, 1997). Otros tipos de DBD son el dominio Fis (*Factor of inversion stimulation*) fusionado directamente al dominio REC o conectado a un dominio AAA<sup>+</sup> ATPasa, típico de la subfamilia NtrC (Batchelor et al., 2008; Lee et al., 2003). En ausencia de fosforilación, la

mayoría de RR exhiben estructuras cerradas como consecuencia de interacciones REC-DBD que los mantienen inactivos (Baikalov et al., 1996; Leonard et al., 2013). Sin embargo, cuando son fosforilados, se interrumpen estas interacciones REC-DBD y adoptan una conformación abierta compatible, que expone el DBD para que interactúe con secuencias específicas del ADN. Una vez se han unido al ADN estos reguladores modulan la activación transcripcional de las secuencias a las que se han unido.

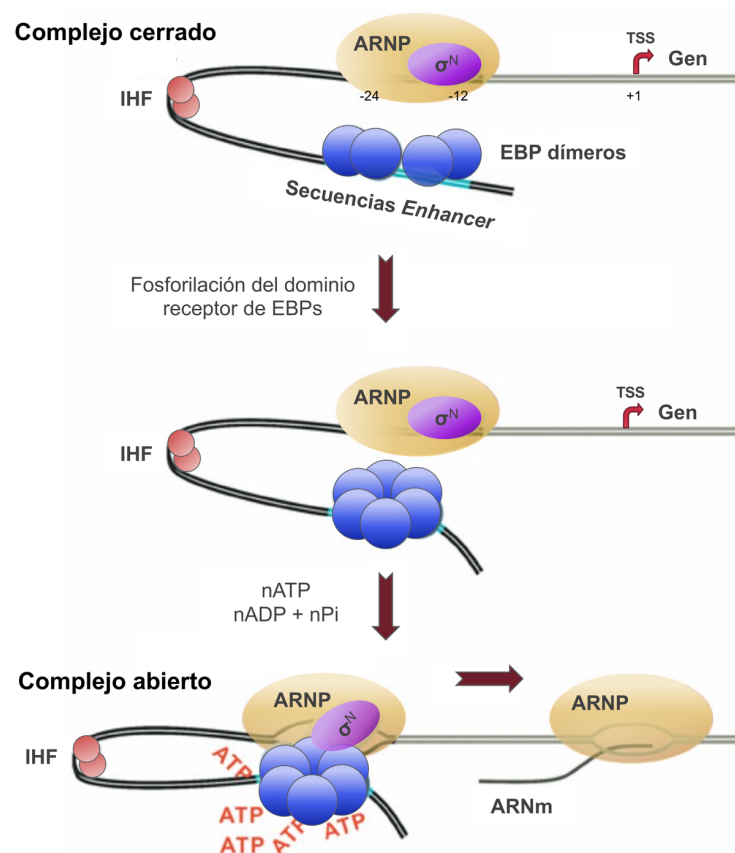
#### 1.2.4. Sistema de dos componentes activadores de promotores dependientes de $\sigma^N$

La transcripción, el primer paso en la expresión génica, es un proceso celular que ocurre en pasos sucesivos en los que interviene una compleja maquinaria celular. El paso inicial consiste en el reconocimiento del promotor y apertura de la doble hebra de ADN mediante la interacción de la ARN polimerasa (ARNP) con secuencias específicas del ADN. Las regiones promotoras albergan sitios de anclaje del complejo formado por las diferentes subunidades de la ARNP asociados a factores sigma ( $\sigma$ ). Los factores  $\sigma$  se unen al núcleo de la ARN polimerasa (*core* o configuración  $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ) y dirige a la holoenzima (*E*- $\sigma$  o configuración  $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ ) a sitios específicos de las regiones promotoras con el fin de formar un complejo cerrado estable que imposibilita la transcripción (Browning & Busby, 2004, 2016).

Los factores sigma de la ARNP se agrupan en dos clases en base a su naturaleza molecular y modo de acción: la familia tipo  $\sigma^{70}$  y la familia tipo  $\sigma^N$  (o  $\sigma^{54}$ ). Los factores  $\sigma^{70}$  reconocen secuencias conservadas en el promotor, localizadas entre las posiciones -35 y -10 respecto al inicio de transcripción (TSS, *Transcriptional Start Site*). Por otra parte, la familia  $\sigma^N$  está compuesta por un único representante, codificado por el gen *rpoN*, y se unen a secuencias centradas en las posiciones -24 y -12 respecto al inicio de transcripción cuya secuencia consenso es  $\text{TGGCAC}(\text{A/G})\text{-N}_4\text{-TTGC}(\text{A/T})$  (Barrios et al., 1999). A esta clase de factores  $\sigma$  se le relaciona con la expresión de genes del metabolismo del nitrógeno y del carbono, modificación de ARN, quimiotaxis, fermentación y patogénesis (Buck et al., 2000; Lonetto et al., 1992; Reitzer & Schneider, 2001).

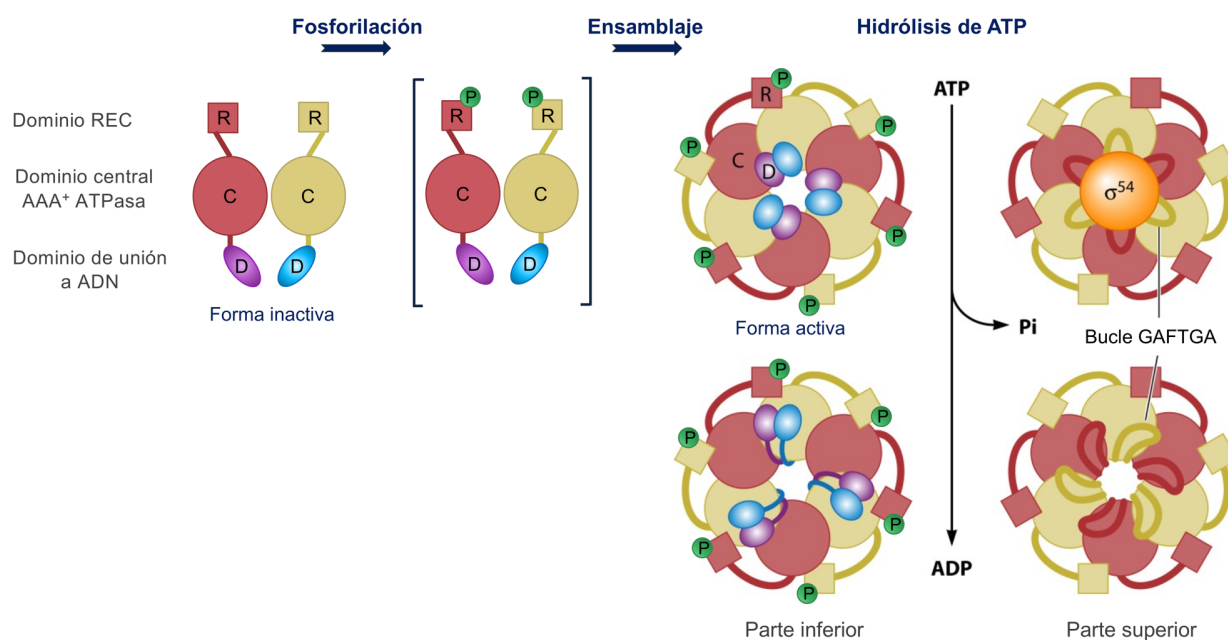
Las familias de factores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^N$  difieren en su estructura y en el mecanismo de iniciación de la transcripción (Merrick, 1993). Mientras que en la mayoría de las bacterias se pueden hallar diversos tipos de factores  $\sigma^{70}$ , no es habitual encontrar más de un tipo de  $\sigma^N$  en un mismo organismo (Buck et al., 2000). A diferencia de otras holoenzimas como ARNP- $\sigma^{70}$ , la holoenzima ARNP- $\sigma^N$  es incapaz de promover su isomerización espontánea al complejo en abierto en el promotor requerido para iniciar la transcripción, requiriendo por tanto el concurso de un activador de la transcripción que la ayude en esa transición (Bush & Dixon, 2012;

Danson et al., 2019; Glyde et al., 2017, 2018). La activación de la transcripción ocurre a distancia gracias al reclutamiento de activadores transcripcionales denominados EBP bacterianos (*b*EBPs, *b*acterial *E*nhancer *B*inding *P*roteins) o proteínas de unión a potenciadores, que catalizan la isomerización del complejo cerrado en abierto, proceso que precisa la hidrólisis de ATP (Gao et al., 2020; Wigneshweraraj et al., 2008; Zhang et al., 2002). A menudo, proteínas accesorias que pliegan el ADN, como la proteína IHF (*I*ntegration *H*ost *F*actor), contribuyen en cierta medida a la formación del complejo abierto, proporcionando una topología adecuada para favorecer la interacción entre las *b*EBP y la ARNP (Bush & Dixon, 2012; Danson et al., 2019; Gao et al., 2020; Glyde et al., 2017, 2018) (Figura 9).



**Figura 9. Mecanismo de activación de la transcripción de promotores dependientes del factor  $\sigma^N$ .** El factor  $\sigma^N$  dirige la unión de la ARN polimerasa (ARNP) a la unión a secuencias conservadas -24 y -12 con respecto al inicio de transcripción (TSS, +1). Arriba, la holoenzima (ARNP- $\sigma^N$ ) forma un complejo cerrado en el cual el ADN permanece en doble cadena. Centro, la intervención de la proteína IHF establece un lazo en el ADN que facilita una interacción más estable entre las proteínas de unión a potenciadores bacterianos (*b*EBPs) y la holoenzima. Abajo, el activador cataliza la isomerización del complejo cerrado a complejo abierto en una reacción que requiere la hidrólisis de ATP. De este modo, el ADN próximo al sitio de inicio de transcripción se desnaturaliza y una de las hebras es usada como ADN molde para transcribirse a ARNm. Modificado de (Chen et al., 2008).

Como paradigma de regulador transcripcional de promotores dependientes de  $\sigma^N$ , destaca NtrC. Aparte de contener un dominio receptor y un dominio de unión a ADN, una peculiaridad de este tipo de activadores es la presencia de un dominio central AAA<sup>+</sup> ATPasa (De Carlo et al., 2006). En el proceso de formación del complejo abierto, el dominio AAA<sup>+</sup> ATPasa es el responsable de inducir su oligomerización en una reacción dependiente de ATP y con la energía producida, remodelar el complejo cerrado a una configuración termodinámicamente favorable (Figura 10) (Gao et al., 2020; Weiss et al., 1991). Simultáneamente, el dominio de unión a ADN dirige esta actividad a un promotor específico.



**Figura 10. Mecanismo de activación de reguladores de respuesta tipo NtrC.** Se muestran cómo la fosforilación del dominio receptor (R) conlleva cambios conformacionales en los bucles GAFTGA del dominio central AAA<sup>+</sup> ATPasa (C, esfera roja) y del dominio de unión a ADN (D, óvalos azul y morado) permitiendo el ensamblaje de las diferentes unidades e inicio de la transcripción. Los dímeros de NtrC se unen al ADN y una vez activados, reclutan un dímero adicional para la oligomerización. Los dominios D se encuentran en la parte inferior del anillo mientras que los bucles GAFTGA están en contacto con el factor  $\sigma^N$  (naranja) desde la parte superior. Tras la liberación del fosfato, los bucles se desenganchan del factor  $\sigma^N$  lo que favorece el inicio de la transcripción. Modificado de (Bush & Dixon, 2012).

En otros grupos de bEBPs, el dominio central AAA<sup>+</sup> ATPasa está totalmente conservado y difieren en el dominio receptor y su modo de regulación. Algunos ejemplos de bEBPs también pertenecientes a sistemas de dos componentes son el regulador del transporte de ácidos C4-dicarboxílicos, DctD (grupo I, estructuralmente equivalente a NtrC) y la proteína FlgR involucrada en movilidad flagelar (grupo V). Otros grupos regulados por interacciones

proteína-proteína son la proteína reguladora de la fijación de nitrógeno NifA (grupo III) y la proteína de choque de fago F PspF (grupo IV) mientras que las proteínas reguladoras del catabolismo del xileno, XylR, y de fenoles, DmpR (grupo II) comprenden sistemas de un componente (Bush & Dixon, 2012; Studholme & Dixon, 2003).

### 1.3. El sistema de dos componentes CbrAB

El sistema de dos componentes CbrAB es exclusivo de la familia *Pseudomonadaceae* y participa en procesos de adaptación nutricional, dotando a las bacterias de una extraordinaria versatilidad metabólica. Se describió por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* como un sistema de regulación implicado en la utilización jerárquica de diversas fuentes de carbono (Nishijyo et al., 2001) y participa también en procesos fisiológicos importantes como la interacción de la bacteria con el medio ambiente que determina su estilo de vida, procesos de quimiotaxis o resistencia a diversos metales (Amador et al., 2010). A fecha de hoy, no se han descrito sistemas ortólogos y la señal activadora del sistema no ha sido identificada, aunque algunos autores sugieren que podría estar relacionada con el balance C:N (Nishijyo et al., 2001; Valentini et al., 2014).

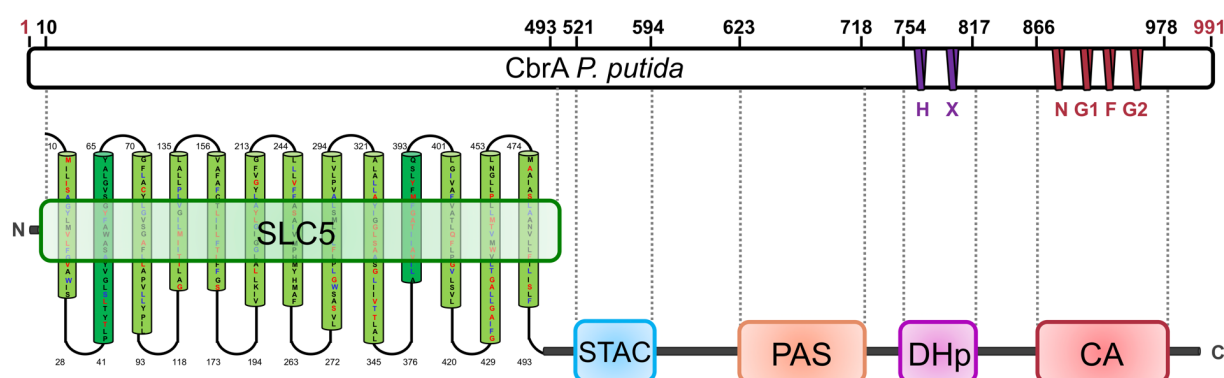
Sus dos componentes principales, la histidina quinasa CbrA y el activador transcripcional CbrB, presentan una identidad del 34 % y 45 % en la secuencia de aminoácidos, respectivamente, con los elementos del sistema de asimilación de nitrógeno NtrB y NtrC, que controla la asimilación de nitrógeno (Zhang & Rainey, 2008). Se ha descrito que ambos sistemas reguladores están interconectados, como demuestra el hecho de que mutaciones que confieren una actividad constitutiva de *ntrB* y *ntrC* supriman el fenotipo de un mutante  $\Delta cbr$  en *P. aeruginosa* (Itoh et al., 2007; Li & Lu, 2007).

#### 1.3.1. La proteína sensora CbrA

CbrA es una histidina quinasa atípica que funciona como regulador global del metabolismo del carbono, la utilización de diversos aminoácidos como fuente de carbono y/o nitrógeno, procesos de virulencia o la resistencia a antibióticos (Amador et al., 2010; Li & Lu, 2007; Nishijyo et al., 2001; Quiroz-Rocha et al., 2017a; Valentini et al., 2014; Yeung et al., 2011). La principal diferencia con la proteína citosólica NtrB, es la presencia de una gran región en su extremo N-terminal (Nt) que contiene 13 dominios transmembrana que mantiene a CbrA anclada a la membrana periplásmica. Aunque inicialmente CbrA se asoció con el grupo de HKs con mecanismos sensores en la región TM por su arquitectura modular, recientes

estudios han demostrado que esta región participa en el transporte de histidina (Zhang et al., 2015).

En *P. putida*, CbrA representa una novedosa familia de receptores HK ya que su estructura sugiere un acoplamiento entre los procesos de señalización y de transporte de una molécula. Su arquitectura modular se asemeja a algunas HKs descritas en *Teredinibacter turnerae* (Figura 6). En base a análisis bioinformáticos, en su estructura se distinguen varios dominios conservados (Figura 11):



**Figura 11. Diagrama de los dominios conservados en CbrA de *P. putida* KT2440.** En la parte superior, se muestra CbrA con las posibles cajas conservadas (H, X, N, G1, F, G2) en el dominio transmisor de su extremo carboxilo. Los números representan la posición de los aminoácidos de la proteína respecto al ATG. En la parte inferior, se representan esquemáticamente los dominios que presenta CbrA: en su extremo N-terminal se encuentra la región transmembrana que conforma el dominio SLC5 y adyacente a éste el dominio STAC; en su región C-terminal se hallan los dominios PAS, DHp y CA.

- a. Dominios transmembrana (TM). La predicción de estructura secundaria aportada por los programas SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>) y RHYTHM (<http://proteininformatics.charite.de/rhythm/>) en base a la secuencia de aminoácidos, sugiere la presencia de un total de 13 dominios TM conectados por bucles hidrofílicos para *P. putida* y de 14 para *P. aeruginosa*. Estos dominios localizados en su extremo N-terminal guardan similitud con la familia de transportadores SLC5 (SoLute Carrier 5) y el transportador simporte de Na<sup>+</sup>/prolina PutP de *E. coli*. Esta clase de proteínas pertenecen a la familia de transportadores simporte Na<sup>+</sup>/solute (dominio SSSF) que usan la energía libre generada en gradientes electroquímicos para mediar la entrada de solutos a través de la membrana (Abramson & Wright, 2009; Jung, 2002; Jung et al., 2018; Watanabe et al., 2010). Aunque los miembros de la familia SLC5 poseen un



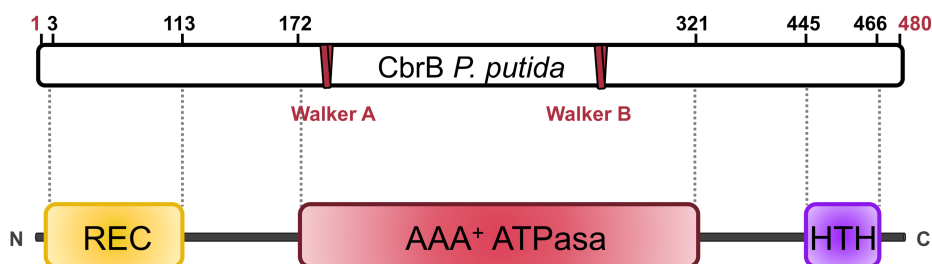
número variable de hélices transmembrana, cuando se hallan asociados a STAC siempre tienen 13 TM, al igual que CbrA de *P. putida* KT2440 (Sepulveda & Lupas, 2017).

- b. Dominio STAC. Pequeño dominio ubicado entre los dominios TM y el dominio catalítico C-terminal, que, según análisis estructurales y bioinformáticos, podría regular el transporte de alguna molécula a través del simporte  $\text{Na}^+$ /solute (Korycinski et al., 2015; Muzhingi et al., 2018). CbrA, junto a CrbS, son los únicos sistemas de dos componentes con dominios STAC que han sido caracterizados experimentalmente hasta el momento (Sepulveda & Lupas, 2017).
- c. Dominio PAS. En los sistemas de dos componentes el dominio PAS está destinado a la recepción de un amplio rango de estímulos mediante diversos mecanismos. En CbrA, se ubica en la región citosólica, próximo al extremo C-terminal (Ct).
- d. Dominio DHp. Junto al dominio CA, conforman el comúnmente conocido como dominio histidina-quinasa (HisKA). Este dominio incluye el residuo de histidina susceptible de fosforilación en la posición His-766 para CbrA (caja H) y también dos  $\alpha$ -hélices (caja X) requeridas para la dimerización de la proteína.
- e. Dominio CA. Es el dominio que cataliza la autofosforilación de CbrA, también conocido como dominio HATPasa. Este dominio alberga motivos de secuencia conservada anotadas como cajas N, G1, F y G2 (Parkinson & Kofoed, 1992). Mientras que mutaciones en las cajas N, G1 y G2 suprimían la actividad autoquinasa, determinadas mutaciones en las cajas N y G1 mantenían la actividad fosfatasa, descartando la participación de las cajas N y G1 en dicha función (Kanamaru et al., 1989; Yang & Inouye, 1993; Zhu & Inouye, 2002).

### 1.3.2. El elemento regulador CbrB

CbrB es un activador transcripcional perteneciente al tercer grupo más grande de reguladores de respuesta de unión a ADN, concretamente, a la subfamilia NtrC constituida por factores de transcripción de promotores dependientes del factor  $\sigma^N$  (Moret & Segovia, 1993). Esta clase de RR oligomerizan cuando son fosforilados, a estados de orden superior (hexámeros, heptámeros, etc.), adquiriendo estructuras en anillo que inducen la formación de complejos abiertos con la ARN polimerasa (Batchelor et al., 2009). CbrB es un activador dependiente de  $\sigma^N$  bastante peculiar puesto que *in vitro* es capaz de activar la transcripción de sus genes dianas hasta un 40 % sin estar fosforilado (García-Mauriño et al., 2013). Al igual que en *P. aeruginosa*, la proteína ortóloga a CbrB en *P. putida* posee tres dominios conservados (Abdou et al., 2011; Studholme & Dixon, 2003) (Figura 12):





**Figura 12. Diagrama de los dominios conservados en CbrB de *P. putida* KT2440.** En la parte superior, se muestran los motivos de Walker (A, B) ubicados en el dominio central de CbrB. Los números representan la posición de los aminoácidos de la proteína respecto al ATG. En la parte inferior, se representan los dominios que presenta CbrB: en el extremo N-terminal se encuentra el dominio receptor (REC), en la región central el dominio AAA<sup>+</sup> ATPasa y en el extremo C-terminal el dominio de unión a ADN tipo HTH.

- Dominio REC.** Situado en su extremo N-terminal, es el dominio receptor de la señal detectada por la proteína sensora que determina la especificidad del regulador de respuesta. Contiene el residuo conservado de aspártico (Asp-52) susceptible a fosforilación por CbrA y ejerce un papel regulador sobre el dominio central a menudo a través del control de la oligomerización (Barroso et al., 2018; Bush & Dixon, 2012; Ghosh et al., 2010; Rappas et al., 2007).
- Dominio AAA<sup>+</sup> ATPasa.** Es el dominio central de CbrB implicado en la interacción entre el activador y el factor  $\sigma^N$  de la ARN polimerasa. Presenta los motivos de unión de nucleótidos Walker A (GESGTGKE) y Walker B (ADGGTLFLDE) en las posiciones 180-187 y 243-252, respectivamente, implicados en la unión e hidrólisis de ATP. Además, guarda un 56 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el mismo dominio de NtrC.
- Dominio HTH.** Corresponde al dominio de unión a ADN y se localiza en su extremo Ct.

### 1.3.3. Control global por CbrAB

CbrB regula la asimilación y metabolismo de algunos aminoácidos y otras fuentes de carbono en distintas especies del género *Pseudomonas* (Amador et al., 2010; Li & Lu, 2007; Nishijyo et al., 2001; Zhang & Rainey, 2008). En *P. fluorescens* SBW25 se ha descrito además que el operón de asimilación de histidina (*hut*) está sujeto a una doble regulación en función de si la histidina actúa como fuente de carbono o nitrógeno. En este sistema, si la histidina es utilizada como fuente de carbono, la asimilación se activa por CbrB desde un promotor dependiente de  $\sigma^N$ , mientras que cuando se emplea como fuente de nitrógeno, podía ser

activada por CbrB o NtrC desde un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  (Zhang & Rainey, 2008). En *P. aeruginosa* se ha descrito también un doble control por los sistemas CbrAB y NtrBC para la asimilación de aminoácidos ramificados (prolina, leucina, isoleucina, valina) y de aminos cuaternarias como colina en la adaptación a entornos hiperosmóticos que constituyen ejemplos donde la función de CbrB y NtrC pueden suplirse (Amador et al., 2010; Li & Lu, 2007; Sánchez et al., 2017).

En nuestro grupo de investigación se han realizado estudios transcriptómicos en *P. putida* mediante *microarrays*, sobre el control global de CbrB, en un medio definido con una mezcla de 21 aminoácidos, que garantizaba la activación específica de las rutas catabólicas correspondientes (Amador et al., 2010). De este trabajo se estableció una interacción del sistema regulador con el metabolismo del carbono, mediante la activación de la isocitrato deshidrogenasa (*PP4012*) y la represión de la isocitrato liasa (*aceA*, primera enzima en derivar hacia el ciclo del glioxilato), que explicaría el fenotipo de deficiencia en crecimiento en citrato del mutante  $\Delta cbrB$ . El TCS CbrAB no solo controla la asimilación y metabolismo de aminoácidos como fuentes de carbono y/o nitrógeno, sino también ciertas funciones fisiológicas como la tolerancia a estrés, la adhesión celular, la motilidad o la quimiotaxis. En estas categorías se identificaron genes implicados en la biosíntesis y exportación de polisacáridos que contribuyen a la adherencia bacteriana como *lapF*, otros codificaban componentes estructurales del flagelo como *fliC* y *flgI* o genes de quimiotaxis como *cheW*. Estos datos fueron validados mediante RT-qPCR, que confirmarían su regulación, aunque no descartaron una posible regulación indirecta a través del sistema Cbr (Amador et al., 2010). CbrB también participa en la utilización de azúcares a través la ruta Entner-Doudoroff y la degradación de benzoato, mediante la regulación de genes que a su vez están reprimidos traduccionalmente por la proteína Crc. Entre ellos, se encuentra el gen *zwf* que codifica a la enzima glucosa 6-P deshidrogenasa, que cataliza la conversión de glucosa-6P en 6-fosfogluconato, o el operón *benABCD* cuyos niveles aparecieron alterados en un fondo  $\Delta cbrB$  sugiriendo la conexión entre ambos sistemas reguladores (Amador et al., 2010; Collier et al., 2001; del Castillo & Ramos, 2007; Hernández-Arranz et al., 2012).

Estudios en nuestro grupo de la interacción directa *in vivo* de CbrB con las secuencias promotoras que regula en *P. putida* mediante ChIPseq, han demostrado que CbrB controla directamente al menos 61 genes (Barroso et al., 2018). De ellos, un 20 % participa en funciones reguladoras como es el caso de los ARN reguladores CrcZ y CrcY (Barroso et al., 2018; García-Mauriño et al., 2013). También parece interaccionar con otros genes de funciones diversas como porinas o transportadores (20 %), enzimas metabólicas (16 %), actividades relacionadas con la traducción de proteínas (5 %) y genes de función no

caracterizada (38 %). Entre estos últimos, el operón *PP2810-13* ha sido objeto de estudio dada su elevada similitud estructural con bombas de extrusión tipo RND que expulsan compuestos potencialmente tóxicos para la célula (Barroso et al., 2018).

La activación directa de los ARN reguladores CrcZ y CrcY por CbrB provoca un efecto muy relevante en el proceso de represión catabólica mediada por Hfq/Crc en *Pseudomonas*, que describiremos más adelante. La elevada expresión de estos ARNs, que son reconocidos por las proteínas Hfq/Crc en motivos ricos en adeninas, tiene un efecto inhibitor en la actividad de las mismas, impidiendo por lo tanto su función en condiciones de crecimiento no represoras (exceso de carbono) (Moreno et al., 2009b; Sonnleitner et al., 2009; Sonnleitner & Bläsi, 2014) (véase más adelante apartado 1.4.1.). En *P. putida*, CrcZ y CrcY se expresan principalmente desde los promotores  $P_{crcZ}$  y  $P_{crcY}$  dependientes de  $\sigma^N$  y son directamente activados por CbrB, pero tienen además una expresión residual desde otros dos promotores  $\sigma^{70}$  que se localizan en las pautas de lectura abiertas situados aguas arriba. Los transcritos largos procedentes de la transcripción *read-through* son inmediatamente procesados para dar lugar a ARNs mensajeros idénticos a los generados a partir de  $P_{crcZ}$  y  $P_{crcY}$ . Esto garantiza unos niveles basales elevados de los ARNs reguladores en condiciones de represión catabólica que suponen un mecanismo de protección frente a un exceso de represión por Hfq/Crc (García-Mauriño et al., 2013; Hernández-Arranz et al., 2016).

Todos estos datos permiten situar al sistema CbrAB en una posición superior a nivel regulatorio controlando directa o indirectamente diferentes aspectos de la fisiología bacteriana que conllevan cambios en los flujos metabólicos precisos para una óptima adaptación al medio ambiente.

#### 1.4. Otros sistemas reguladores de la asimilación del carbono en *Pseudomonas*

La capacidad de *P. putida* para colonizar nichos ecológicos de muy diversa naturaleza depende de una coordinada expresión génica por un gran número de mecanismos reguladores codificados en su genoma. El metabolismo bacteriano está sujeto a diferentes niveles de regulación que van desde la regulación transcripcional y la degradación del ARNm hasta la regulación traduccional y la consiguiente modificación y activación de una proteína sintetizada. La compleja red de regulación del proceso de asimilación jerárquica de diversas fuentes de carbono en *Pseudomonas* se extiende más allá del sistema de dos componentes CbrAB, e incluye otros sistemas de control transcripcional como los factores sigma extracitoplásmicos del tipo ECF, o elementos de regulación post-transcripcional como el sistema de represión catabólica Hfq/Crc.

El control transcripcional de la expresión génica está condicionado por la participación de los distintos factores sigma que intervienen en la formación del complejo cerrado junto a la ARN polimerasa, y que aportan la especificidad en el reconocimiento del promotor. El factor  $\sigma$  vegetativo RpoD ( $\sigma^{70}$ ) es quien controla la expresión basal de la mayoría de los genes durante el crecimiento exponencial, pero las bacterias del género *Pseudomonas* contienen además un elevado número de factores  $\sigma$  alternativos funcionando como reguladores transcripcionales en respuestas a señales medioambientales concretas (Gruber & Gross, 2003). Determinados factores sigma alternativos como los factores  $\sigma$  de función citoplásmica (ECFs) suponen un mecanismo regulador ventajoso para generar una respuesta rápida frente a fluctuaciones ambientales (Potvin et al., 2008).

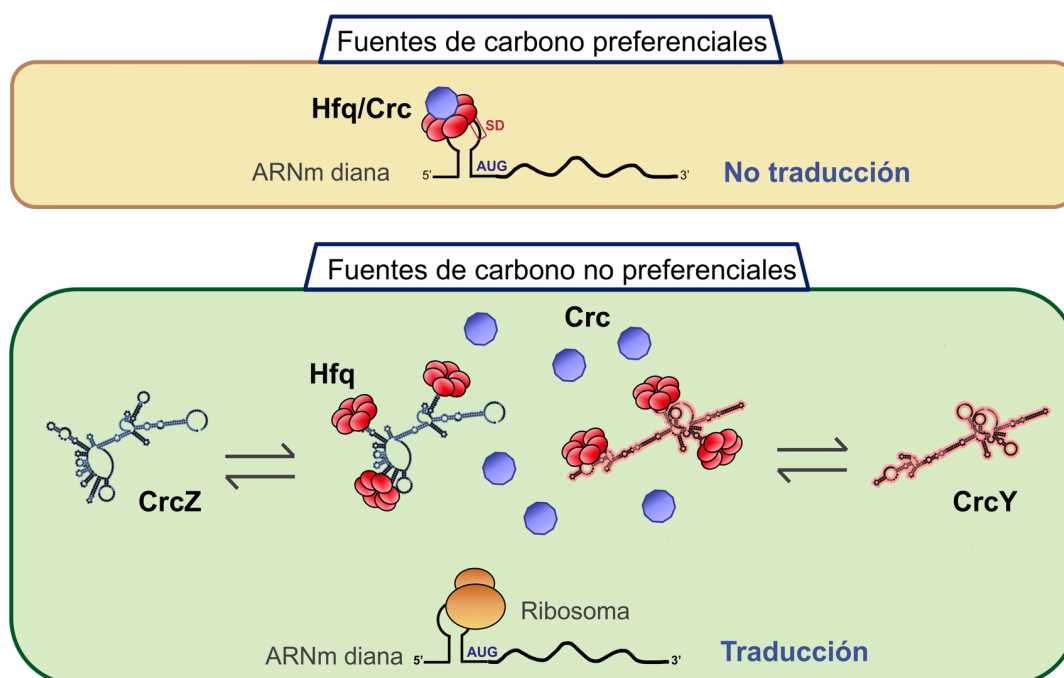
#### 1.4.1. Represión catabólica y modelo de regulación ejercida por Hfq/Crc

Las bacterias ambientales de estilo de vida libre y metabólicamente versátiles como *P. putida* albergan sistemas de regulación global que hacen posible asimilar selectivamente los nutrientes preferidos entre una mezcla de fuentes de carbono mediante un proceso de control denominado represión catabólica de carbono (CCR, *Carbon Catabolite Repression*) (Görke & Stülke, 2008; Rojo, 2010). En *Pseudomonas*, la CCR está controlada por el complejo proteico Hfq/Crc, cuya actividad está modulada por la presencia los ARN reguladores CrcZ y CrcY en *P. putida* (Moreno et al., 2012) o CrcZ, CrcY y CrcX en *P. syringae* (Filiatrault et al., 2013). Aunque inicialmente Crc se describió como una proteína de unión a ARNm (Moreno et al., 2007), el análisis de la estructura cristalizada en *P. aeruginosa* y ensayos de retardo en gel con preparaciones de Crc de mayor pureza descartaron la existencia de una zona de unión al ARNm (Milojevic et al., 2013). Por otro lado, Hfq es una chaperona hexamérica de ARN con amplias funciones reguladoras que van desde la riboregulación hasta la represión traduccional de ARNm (Kavita et al., 2018; Vogel & Luisi, 2011). Hfq actúa como catalizador en la unión de un ARNp a su ARNm diana de modo que puede reprimir o activar la traducción dependiendo si el sitio de unión del ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*) queda enmascarado o expuesto, respectivamente. Asimismo, Hfq estabiliza y protege a los ARNs y en determinadas ocasiones interacciona con la ARNasa E y otros componentes del degradosoma facilitando la degradación de ciertos ARNms (De Lay et al., 2013; Sauer, 2013).

Más allá de su relevante papel en represión catabólica, Crc junto a Hfq también modula procesos como la formación de *biofilm* (O'Toole et al., 2000), la producción de piocianina (Hester et al. 2000a; Huang et al., 2012) y ramnolípidos (Yang et al., 2015), *quorum sensing* (Zhang et al., 2013), la secreción de factores de virulencia proteínicos (Reales-Calderón et

al., 2015) y la resistencia a antibióticos (Linares et al., 2010). Hallazgos recientes han descrito que Hfq se une a más de 600 transcritos nacientes a menudo en cooperación con Crc llegando a considerar el regulón de Crc como un subconjunto del extenso regulón de Hfq (Kambara et al., 2018).

El modelo actual de regulación post-transcripcional del complejo Hfq/Crc establece la unión de Hfq a motivos ricos en adeninas denominada secuencia de actividad catabólica (CA), localizada en el extremo 5' del ARNm diana, y cuya secuencia consenso correspondiente es AAnAAnAA, donde n indica cualquier nucleótido (Moreno et al., 2009b; Sonnleitner & Bläsi, 2014). Según este modelo, la posterior unión del regulador central Crc a Hfq promueve la formación de un complejo más estable que impide la formación del complejo ternario 30S-ARNt<sup>Met</sup>-ARN y, por consiguiente, la inhibición completa de la traducción del ARNm diana (Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al., 2018) (Figura 13). No obstante, aún no se ha identificado una zona potencial de interacción entre Crc y Hfq ni tampoco un sitio específico de unión de Crc al ARNm (Moreno et al., 2015).



**Figura 13. Mecanismo de regulación post-transcripcional del complejo Hfq/Crc en *P. putida*.** En presencia de fuentes de carbono preferenciales, el fenómeno de represión catabólica se manifiesta a través de la represión traduccional efectuada por el complejo Hfq/Crc. Hfq se une a secuencias aguas arriba de la *Shine-Dalgarno* (SD) de determinados ARNm diana y, tras la estabilización con Crc, se inhibe la formación del complejo de iniciación de la traducción. Cuando se agotan las fuentes de carbono preferenciales, se incrementan los niveles de los ARNs CrcZ y CrcY que secuestran a Hfq y, por tanto, contrarrestan la represión traduccional.

CrcZ y CrcY funcionan como interruptores moleculares del control de la represión catabólica de modo que cuando las fuentes de carbono preferenciales se consumen, estos ARNs reguladores se sobreexpresan y secuestran al complejo Hfq/Crc permitiendo así la traducción de sus ARNm diana (Sonnleitner et al., 2009, 2017; Sonnleitner & Bläsi, 2014) (Figura 13). Las condiciones de máxima represión catabólica en *P. putida* han sido detectadas en un medio rico LB donde la expresión de CrcZ y CrcY se reduce considerablemente y las condiciones de mínima CCR en fuentes no preferenciales como histidina y oxalacetato (Monteagudo-Cascales et al., 2019; Moreno et al., 2012; Moreno & Rojo, 2008). Aunque se desconoce la señal molecular clave en la CCR, se ha observado una expresión diferencial de CrcZ y CrcY en función de la fuente de carbono (Valentini et al., 2014) y la temperatura (Fonseca et al., 2013).

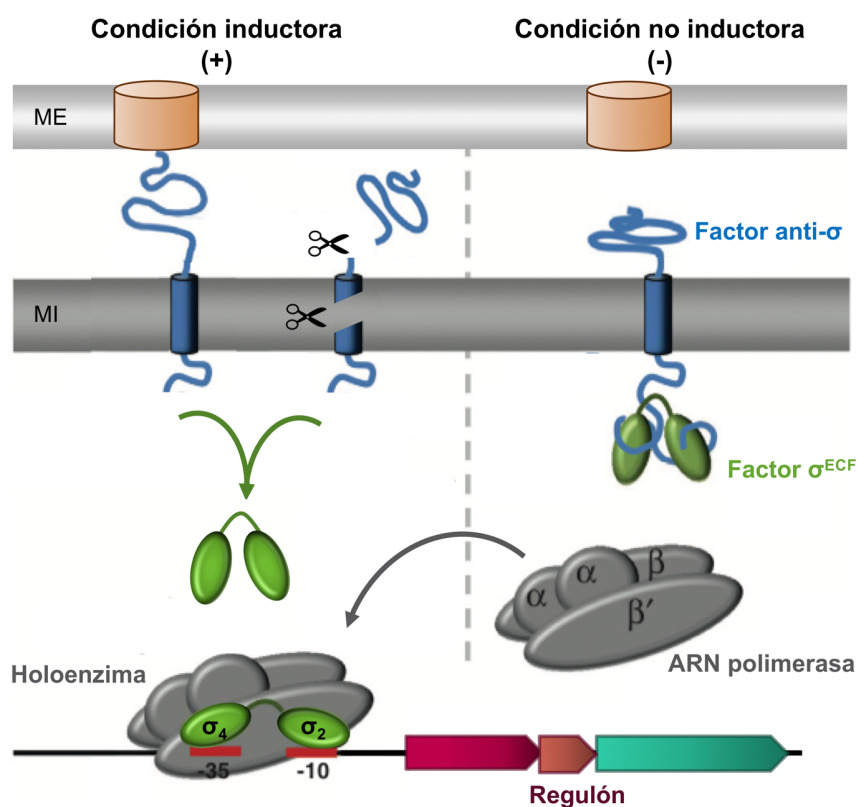
La regulación global que ejerce Crc es bastante compleja al ocurrir en varios niveles reprimiendo reguladores transcripcionales y reguladores post-transcripcionales. Por tanto, los efectos indirectos derivados de estos reguladores aumentan la complejidad de predicción de la actividad post-transcripcional de Hfq/Crc. No obstante, la conexión entre dos procesos regulatorios en *P. putida* aparentemente no relacionados como son el sistema de asimilación de carbono CbrAB mediante la activación transcripcional de CrcZ y CrcY con el regulador central Hfq/Crc, lo hace especialmente atractivo para entender el fenómeno global de CCR.

#### 1.4.2. Factores sigma-antisigma: SigX

Los factores sigma de función extracitoplásmica ( $\sigma^{\text{ECF}}$ , *Extracytoplasmic Function*) pertenecientes a la IV subfamilia de factores  $\sigma^{70}$ , constituyen el grupo más diverso de factores sigmas alternativos. Hasta 1994 no fueron identificados por (Lonetto et al., 1994) y su denominación hace referencia a su papel en la respuesta a estímulos provenientes de la membrana citoplásmica o del exterior celular. En estructura son relativamente pequeños y simples puesto que comparten dos ( $\sigma_2$  y  $\sigma_4$ ) de cuatro dominios funcionales conservados presentes en otros factores  $\sigma$ . En el reconocimiento específico de la secuencia de unión del factor sigma al promotor, los dominios  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$  se unen a las cajas conservadas en las posiciones -10 y -35, respectivamente, respecto al TSS (Hermann, 2002). La enorme cantidad de factores que albergan las bacterias, cada uno de los cuales reconoce distintos promotores, les permiten expresar genes específicos en función de las condiciones externas (Edgar et al., 2014; Gruber & Gross, 2003; Paget & Hermann, 2003).

Con frecuencia, los factores  $\sigma^{\text{ECF}}$  son regulados negativamente por sus correspondientes factores antisigma (anti- $\sigma$ ), muchos de los cuales se asocian a membrana,

de modo que sólo se activan en condiciones específicas de crecimiento o respuesta a estímulos ambientales incluido estrés de membrana o pared celular, niveles de hierro o el estado de oxidación (Ho & Ellermeier, 2012). Además, suelen estar codificados por genes adyacentes a sus respectivos factores anti- $\sigma$  en la misma unidad transcripcional e incluso solapados en una *orf* (Starón et al., 2009). La unión del factor  $\sigma$  con el factor anti- $\sigma$  proporciona un sofisticado mecanismo de control adicional de la actividad transcripcional de determinados promotores. En condiciones en las que el sistema no está activo, el factor  $\sigma$  se halla secuestrado y asociado a su respectivo factor anti- $\sigma$ . En condiciones inductoras, esas interacciones proteína-proteína desaparecen de modo que el factor  $\sigma$  queda liberado para iniciar una cascada de regulación (Butcher et al., 2008; Helmann, 2002; Mascher, 2013) (Figura 14). Sin embargo, existen escasos casos en los que las interacciones  $\sigma$ /anti- $\sigma$  hayan sido caracterizadas a nivel molecular (Edgar et al., 2014).



**Figura 14. Esquema general del mecanismo de transducción de señales dependiente de factores  $\sigma^{ECF}$ .** En ausencia de estímulo (derecha), el factor  $\sigma^{ECF}$  se halla secuestrado por el factor anti- $\sigma$  que generalmente es una proteína de membrana, aunque también puede ser una proteína soluble. Cuando se percibe un determinado estímulo (izquierda), el factor  $\sigma^{ECF}$  queda liberado mediante diferentes mecanismos (proteólisis, cambios conformacionales, etc.) para unirse al núcleo de la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de genes específicos. El factor  $\sigma^{ECF}$ , el factor anti- $\sigma$  y los procesos asociados se representan en verde y azul, respectivamente. La ARNP se indica en color gris junto a sus cuatro subunidades ( $\alpha_2\beta\beta'$ ). ME: membrana externa, MI: membrana interna. Modificado de (Mascher, 2013).

*P. putida* codifica en su genoma un elevado número de factores sigma ECF, en comparación con otros microorganismos. Los análisis *in silico* han identificado 24 factores  $\sigma$  alternativos, de los cuales 19 son miembros de la subfamilia ECF (Martínez-Bueno et al., 2002). Los factores  $\sigma^{\text{ECF}}$  parecen estar asociados a procesos celulares como el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Cases et al., 2003b), la movilidad (Österberg et al., 2010), la producción de polihidroxialcanoato (Hoffmann & Rehm, 2004), la colonización radicular de la planta (Martínez-Gil et al., 2010), la resistencia a antibióticos y estrés oxidativo (Tettman et al., 2014) o la adquisición de hierro (Bastiaansen et al., 2017, 2014; Venturi et al., 1995).

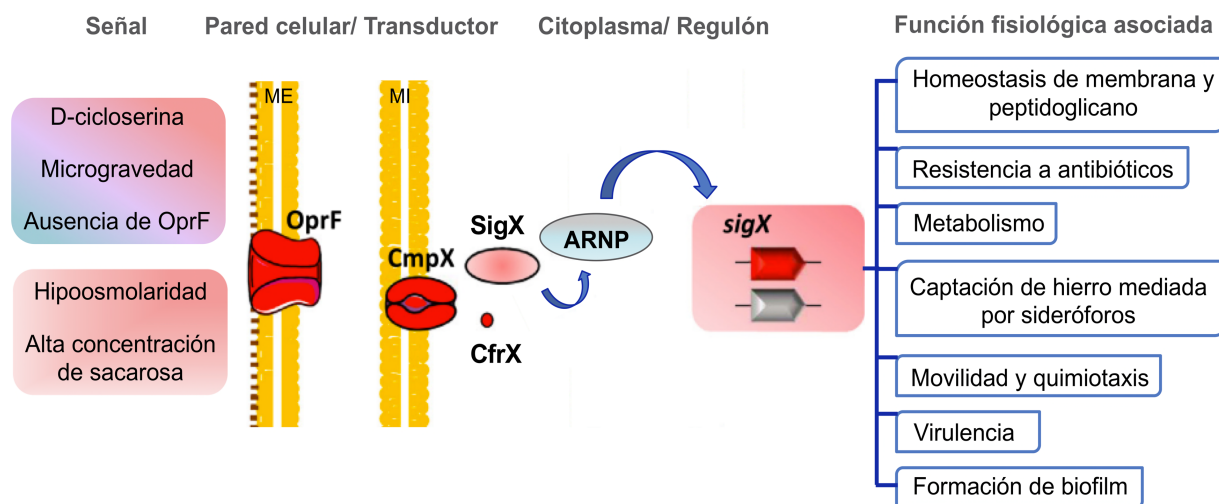
El factor  $\sigma^{\text{ECF}}$  SigX pertenece al subgrupo ECF01 (tipo RpoE) y comparte un 49 % de similitud con su homólogo SigW de *Bacillus subtilis*, que regula la fluidez de la membrana proporcionándole mayor resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Cao & Helmann, 2004). En *P. aeruginosa* un mutante deficiente en *sigX* presentó un comportamiento similar, exhibiendo una alteración en la morfología, fluidez y composición de ácidos grasos en la membrana celular (Blanka et al., 2014; Duchesne et al., 2013; Fléchard et al., 2018). Además, en condiciones de estrés osmótico SigX activa la transcripción de OprF, una de las principales porinas de membrana externa en *Pseudomonas* (Bouffartigues et al., 2012; Brinkman et al., 1999).

La organización genómica del gen *sigX* (PP2088 en *P. putida*, PA1776 en *P. aeruginosa*) está conservada en todos los genomas secuenciados del género *Pseudomonas* (Winsor et al., 2016). Los genes *cfrX-cmpX*, localizados aguas arriba de *sigX*, constituyen un operón donde *cmpX* codifica a una proteína de membrana citoplásmica con un dominio funcional MscS, típico de canales mecanosensibles que brindan protección contra el choque hipoosmótico durante la apertura transitoria de poros en la membrana citoplásmica (Bass et al., 2002). Hasta el momento, SigX se considera un factor  $\sigma^{\text{ECF}}$  huérfano, puesto que no se ha conseguido demostrar que el hipotético factor anti- $\sigma$  estuviera codificado por el mismo operón. Aunque CfrX carece de los dominios estructurales típicos de un factor anti- $\sigma$ , se ha propuesto como el factor anti- $\sigma$  asociado a SigX al mostrar una región N-terminal más corta candidata a dominio anti- $\sigma$  (Staroń et al., 2009). Estudios comparativos de transcriptómica, ChIP-seq y RT-qPCR han confirmado que SigX regula la expresión de su propio gen y que su transcripción puede estar controlada por distintas regiones promotoras ubicadas aguas arriba de la región intergénica *cmpX-sigX* (Bouffartigues et al., 2017; Gicquel et al., 2013; Schulz et al., 2015).

Por otra parte, se ha demostrado que las condiciones en las que se aprecia un incremento en la expresión de *sigX* son de naturaleza diversa: microgravedad, concentraciones subletales del antibiótico D-cicloserina, ausencia de la porina OprF,



concentraciones altas de sacarosa y baja osmolaridad en LB (Figura 15) (Chevalier et al., 2019). Estas condiciones conducen a un estrés en la envuelta celular y, en respuesta, SigX modula la expresión de aproximadamente 347 genes que conforman su regulón (Schulz et al., 2015).



**Figura 15. Esquema del mecanismo de activación y las funciones fisiológicas del factor  $\sigma^{\text{ECF}}$  SigX en *P. aeruginosa*.** Los estímulos que generan un estrés en la pared celular se representan en la columna de la izquierda. En la membrana externa se muestra la proteína OprF implicada en la transducción de la señal, en la membrana interna CmpX y en el citosol el supuesto factor anti- $\sigma$  de SigX, CfrX. En la columna de la derecha se indican las principales funciones fisiológicas de SigX. ME: Membrana externa, MI: Membrana interna. Modificado de (Chevalier et al., 2019).

La principal consecuencia de la ausencia de SigX en *Pseudomonas* es la reducción de la fluidez de membrana, lo que conlleva la alteración en el anclaje y/o la actividad de transportadores de membrana implicados en la captación de nutrientes. El efecto más drástico sobre la fisiología del mutante  $\Delta sigX$  fue la desregulación de genes del metabolismo energético y del metabolismo nutricional (fuentes de carbono, aminoácidos, ácidos grasos y fosfolípidos) (Flécharde et al., 2018). Muchos de los supuestos genes dianas de SigX están representados en los regulones de los factores de transcripción Anr, CbrB, GacA, LasR y RhIR y del regulador global de represión catabólica, Crc (Binder et al., 2016; Flécharde et al., 2018).

En *P. aeruginosa*, la delección de SigX conllevó alteraciones en la red regulatoria del complejo regulador Hfq/Crc y el TCS CbrAB. La comparación de los perfiles genéticos de expresión durante el crecimiento en LB entre los mutantes  $\Delta crc$  y  $\Delta sigX$  exhibió varias similitudes, entre ellas, la expresión de 48 genes controlados por Crc se vio comprometida al deleccionar *sigX*. Algunos ejemplos son los genes relacionados con el transporte y

metabolismo de aminoácidos (operones *bkdA1A2B*, *hutUHIG*, *liuABCD*, *phhAB*) y de fuentes de carbono no preferenciales (porinas OpdP/Q/H o el transportador de succinato y fumarato, DctA). Asimismo, se observó una reducción sutil del fenómeno de represión catabólica en LB al descubrirse que el sistema CbrAB estaba sobreactivado en un mutante  $\Delta sigX$ . Precisamente, la transcripción de *CrcZ*, perteneciente al regulón del TCS CbrAB, se vio incrementada del orden de 2.39 veces con respecto al organismo silvestre, interfiriendo pues en la actividad de los reguladores traduccionales Hfq/Crc (Flécharde et al., 2018). Por tanto, es evidente la compleja interconexión entre las diferentes vías de regulación de procesos celulares controlados por SigX, el complejo Hfq/Crc así como por el sistema de dos componentes CbrAB.

## OBJETIVOS



1. Estudio de la función de CbrX y su efecto sobre los principales componentes del sistema CbrAB.
2. Caracterización de los dominios estructurales de CbrA, análisis fenotípico de los diferentes mutantes en CbrA y localización subcelular de la proteína.
3. Determinación del origen y la naturaleza de la señal activadora el sistema Cbr.
4. Identificación de otros sistemas reguladores implicados en la respuesta a limitación de carbono junto al sistema CbrAB.



## MATERIALES Y MÉTODOS





### 3.1. Estirpes, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo

#### 3.1.1. Estirpes utilizadas en esta tesis

Tabla 3. Tabla de estirpes.

Estirpe	Genotipo (*)	Referencia
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<b>DH5α</b>	F <sup>-</sup> Φ80 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<b>DH5α λ-<i>pir</i></b>	F <sup>-</sup> Φ80 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> , lisogenizada con λ <i>pir</i>	(Platt et al., 2000)
<b>ER2566</b>	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>fhuA2 lon ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> Δ( <i>mcrC-mrr</i> )114::IS10 R[ <i>mcr-73::miniTn10</i> (Tc <sup>S</sup> )]2 R[( <i>zgb-210::Tn10</i> (Tc <sup>S</sup> )] <i>endA1 dcm</i>	New England Biolabs
<b>BL21 (DE3) pLysS</b>	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> λ(DE3) pLysS (CamR)(λ(DE3): <i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7 gene 1</i> , <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i> ), Cm <sup>r</sup>	New England Biolabs
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>		
<b>KT2440</b>	mt-2, <i>hsdR1</i> (r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> )	(Bagdasarian et al., 1981)
<b>KT2442</b>	mt-2, <i>hsdR1</i> (r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> ), Rif <sup>r</sup>	(Franklin et al., 1981)
<b>KT2442-C1</b>	KT2442 <i>crc::Tc</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ,	(Ruiz-Manzano et al., 2005)
<b>MPO451</b>	KT2442 miniTn7BB-Gm:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pME6182]	(Valentini et al., 2014)
<b>MPO493</b>	KT2442 Δ <i>cbrXA::Km</i> , Km <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> [pMPO485]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO494</b>	MPO493 FRT-Km escindida, Rif <sup>r</sup> [pME6182]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO495</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO497</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub><i>cbrA-cbrX</i></sub> (ATG1)- <i>cbrA</i> ]:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO434]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO498</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub><i>cbrA-cbrXA</i></sub> ]:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1317]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO506</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub><i>tac-cbrA</i></sub> ΔTM]:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO358]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO507</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub><i>cbrA-cbrA</i></sub> ΔPAS]:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1324]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO508</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub><i>cbrA-cbrA</i></sub> ΔTM]:: <i>glmS</i> , Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1325]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)

<b>MPO513</b>	MPO494miniTn7BB-Gm[P <sub>cbrA</sub> -cbrX(ATG2)-cbrA]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1344]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO514</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub>cbrA</sub> -cbrX(ATG1&2)-cbrA]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1349]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO515</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub>tac</sub> -cbrA ΔPAS]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> pMPO1348]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO518</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub>tac</sub> -cbrA ΔTM::gfpmut3]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1358]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO519</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub>tac</sub> -cbrA::gfpmut3]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1359]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO520</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub>cbrA</sub> -cbrA::gfpmut3]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1261]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO521</b>	MPO494miniTn7BB-Gm[P <sub>cbrA</sub> -cbrA-ΔTM::gfpmut3]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1367]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO522</b>	MPO494 miniTn7BB-Gm[P <sub>cbrA</sub> -cbrX(ΔT)-cbrA]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1368]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO529</b>	MPO494miniTn7BB-Gm[P <sub>cbrA</sub> -cbrX(ΔT+C)-cbrA]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1369]	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>MPO536</b>	KT2442 miniTn7BB-Gm::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1379]	Esta tesis
<b>MPO537</b>	KT2442-C1 miniTn7BB-Gm::glmS, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> [pMPO1379]	Esta tesis
<b>MPO540</b>	KT2442 miniTn7BB-Gm[P <sub>crz</sub> ::aadA]::glmS, Rif <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1265]	Esta tesis
<b>MPO548</b>	KT2442-C1 miniTn7BB-Gm[P <sub>crz</sub> ::aadA]::glmS, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> [pMPO1265]	Esta tesis
<b>MPO951</b>	MPO548 miniTn5-Km::mnmG, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO952</b>	MPO548 miniTn5-Km::nuoB, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO953</b>	MPO548 miniTn5-Km::PP2379, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO954</b>	MPO548 miniTn5-Km::cyoA, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO955</b>	MPO548 miniTn5-Km::yhhJ, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO956</b>	MPO548 miniTn5-Km::aceA, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO957</b>	MPO548 miniTn5-Km::PP2034, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO958</b>	MPO548 miniTn5-Km::nuoH, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO959</b>	MPO548 miniTn5-Km::nuoC, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO960</b>	MPO548 miniTn5-Km::vacB, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO961</b>	MPO548 miniTn5-Km::cyoC, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO962</b>	MPO548 miniTn5-Km::methH, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO963</b>	MPO548 miniTn5-Km::maf, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO964</b>	MPO548 miniTn5-Km::rsmE, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO965</b>	MPO548 miniTn5-Km::nuoN, Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis

<b>MPO966</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>PP0906</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO967</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>PP0896</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO968</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>dacA</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO969</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>pykA</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO970</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>trpC</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO971</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>nuoK</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO972</b>	MPO548 miniTn5-Km:: <i>gllC</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MPO973</b>	KT2442 $\Delta$ <i>sigX</i> , Rif <sup>r</sup> [pMPO1283]	Esta tesis
<b>MPO974</b>	KT2442-C1 <i>crc</i> ::Tc, $\Delta$ <i>sigX</i> , Rif <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> [pMPO1283]	Esta tesis

(\*) Se indica entre corchetes el plásmido que portaba la inserción en el sitio Tn7 del cromosoma.

### 3.1.2. Plásmidos utilizados en esta tesis

Tabla 4. Tabla de plásmidos.

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
<b>pBluescript SK (+)</b>	II Vector de clonación. Ap <sup>r</sup> .	Stratagene
<b>pEMG</b>	Plásmido suicida empleado en el sistema de edición de genomas bacterianos basado en <i>SceI</i> . <i>oriR6K</i> , Mob <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup> .	(Martínez-García & de Lorenzo, 2011)
<b>pEX18Tc</b>	Plásmido destinado a intercambio alélico derivado de pUC18. Tc <sup>r</sup> , <i>oriT</i> , <i>sacB</i> <sup>+</sup> , Mob <sup>+</sup> .	(Hoang et al., 1998)
<b>pFLP2</b>	Vector de expresión de la flipasa para escindir casetes flanqueados por FRTs. Ap <sup>r</sup> .	(Hoang et al., 1998)
<b>pIZ1016</b>	Vector de expresión de amplio espectro conteniendo el casete de expresión <i>lacI</i> <sup>q</sup> - <i>P<sub>tac</sub></i> . Gm <sup>r</sup> .	(Martínez-Pérez et al., 2004)
<b>pME6182</b>	Plásmido que porta el transposón miniTn7. Replicón <i>colE1</i> , Gm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> .	(Humair et al., 2009)
<b>pMPO200</b>	Vector de amplio espectro para fusiones traduccionales a <i>lacZ</i> basado en pBBR1MCS-4. Mob <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup> .	(García-Gonzalez et al., 2005)
<b>pMPO234</b>	Vector de amplio espectro para fusiones transcripcionales <i>trp-lacZ</i> basado en pBBR1MCS-4. Mob <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup> .	(Porrúa et al., 2009)
<b>pMPO284</b>	Plásmido derivado de pPS854 que contiene el marcador de resistencia a kanamicina del vector pUTminiTn5-Km flanqueado por FRTs. Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> .	(Jimenez-Fernandez et al., 2015)
<b>pMPO355</b>	Fusión transcripcional <i>P<sub>PP2810</sub>::gfpmut3::lacZ</i> en pMRB1 clonada <i>EcoRI/BamHI</i> por escisión de <i>P<sub>PP2810</sub></i> (474 pb) desde pMPO420. Ap <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO356</b>	Fusión transcripcional <i>P<sub>crcZ</sub>::gfpmut3::lacZ</i> en pMRB1 clonada <i>EcoRI/BamHI</i> por escisión de <i>P<sub>crcZ</sub></i> (307 pb) desde pMPO1316. Ap <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pMPO357	Fusión transcripcional $P_{crcY}::gfpmut3::lacZ$ en pMRB1 clonada <i>EcoRI/BamHI</i> por escisión de $P_{crcY}$ (206 pb) desde pMPO1314. Ap <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO358	( $P_{tac}-cbrA$ ΔTM) Clonación de <i>cbrA</i> soluble (CbrA <sup>Δ28-1575</sup> ) bajo la expresión del promotor heterólogo $P_{tac}$ en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO420	Fusión transcripcional $P_{PP2810}::lacZ$ en pMPO234 clonada <i>EcoRI/BamHI</i> conteniendo la secuencia entre las posiciones -472 a -10 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Barroso et al., 2018)
pMPO434	Clonación de <i>cbrX</i> con una mutación puntual en el primer ATG a GCA (Met>Ala), junto a la secuencia de <i>cbrA</i> completa en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO483	( $P_{sal}-cbrA$ ΔTM) Clonación de <i>cbrA</i> soluble (CbrA <sup>Δ28-1575</sup> ) bajo la expresión del promotor heterólogo $P_{sal}$ en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	Sin publicar
pMPO484	Vector derivado de pEX18Tc con las regiones homólogas izquierda (L) y derecha (R) flanqueantes a <i>cbrA</i> . Tc <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO485	Clonación del gen de resistencia a kanamicina entre las regiones homólogas flanqueantes (L y R) a <i>cbrA</i> en pMPO484. Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1259	Fusión traduccional $P_{cbrA}'-lacZ$ que contiene un desfase compensado (-1,+1) en <i>cbrX</i> , clonado <i>EcoRI/XmaI</i> en pMPO200 (coord. -421 a +249 al ATG) . Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1261	( $P_{cbrA}-cbrA'$ - $gfpmut3$ ) Clonación en fase de la secuencia silvestre de <i>cbrA</i> expresado bajo su propio promotor, con <i>gfpmut3</i> en pMPO1359 digerido <i>SpeI</i> (romo)/ <i>KspI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1265	Fusión transcripcional $P_{crcZ}::aadA$ en pMPO1379 clonada <i>EcoRI/XhoI</i> . Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1279	(CbrA'-inteína-CBD) Secuencia completa de <i>cbrA</i> fusionada a la inteína en su extremo carboxilo, clonada en el vector de expresión pTXB1 en <i>NdeI/SpeI</i> . Ap <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1280	(CbrA-ΔTM'-inteína-CBD) Secuencia de <i>cbrA</i> soluble fusionada a la inteína en su extremo carboxilo, clonada en el vector de expresión pTXB1 en <i>NdeI/SpeI</i> . Ap <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1282	Clonación de las regiones flanqueantes al gen <i>sigX</i> en pBluescript II SK (+) <i>SacI/BamHI</i> . Ap <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1283	Subclonación de las regiones flanqueantes de <i>sigX</i> como único inserto <i>SacI/BamHI</i> en pEMG. Km <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1284	Fusión transcripcional $P_{crcZ}::lacZ$ en pMPO1316 al cual se le ha intercambiado el marcador de resistencia a ampicilina por apramicina. Mob <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1314	Fusión transcripcional $P_{crcY}::lacZ$ en pMPO234 clonada <i>EcoRI/BamHI</i> conteniendo la secuencia entre las posiciones -195 y -2. Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(García-Mauriño et al., 2013)

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pMPO1316	Fusión transcripcional $P_{crcZ}::lacZ$ en pMPO234 clonada <i>EcoRI/BamHI</i> conteniendo la secuencia entre las posiciones -298 y -1. Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(García-Mauriño et al., 2013)
pMPO1317	( $P_{cbrA-cbrA}$ ) Clonación de <i>cbrA</i> expresado bajo su propio promotor en pME6182 <i>HindIII/SmaI</i> con las (coord. -421 a +3022 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Valentini et al., 2014)
pMPO1319	Fusión transcripcional $P_{cbrB}::lacZ$ en pMPO234 clonada <i>EcoRI/SmaI</i> conteniendo la secuencia entre las posiciones -490 a +20 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(García-Mauriño et al., 2013)
pMPO1324	( $P_{cbrA-cbrA \Delta PAS}$ ) Clonación de <i>cbrA</i> y su promotor con una delección en fase del dominio PAS ( $CbrA^{\Delta 1881-2108}$ ), en pME6182 digerido <i>HindIII/SmaI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1325	( $P_{cbrA-cbrA \Delta TM}$ ) Clonación de la región promotora de <i>cbrA</i> fusionada a una versión truncada de la proteína desde la diana <i>EcoRI</i> que contiene la región 3' de <i>cbrA</i> sin incluir dominios TM ( $CbrA^{\Delta 4-1575}$ ), en pME6182 digerido <i>HindIII/KpnI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1327	Fusión traduccional $P_{cbrB}'-lacZ$ en pMPO200 clonada <i>EcoRI/SmaI</i> conteniendo la secuencia entre las posiciones -493 a +17 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(García-Mauriño et al., 2013)
pMPO1338	Plásmido derivado de pMPO1324 al cual se le ha anulado la diana de restricción de <i>NcoI</i> localizada aguas abajo del polilinker. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1344	Clonación de <i>cbrX</i> con una mutación puntual en el segundo ATG a GAT (Met>Asp), junto a la secuencia completa de <i>cbrA</i> en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1347	Plásmido derivado de pMPO1338 al cual se le ha clonado una <i>Shine-Dalgarno</i> sintética sustituyendo la región promotora de <i>cbrA</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1348	( $P_{tac-cbrA \Delta PAS}$ ) Clonación de la secuencia completa de <i>cbrA</i> y su promotor con una delección en fase del dominio PAS ( $CbrA^{\Delta 1881-2108}$ ) bajo la expresión del promotor heterólogo $P_{tac}$ en pMPO1347. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1349	Clonación de <i>cbrX</i> con mutaciones puntuales en ambos ATG iniciadores (ATG1&2). Contiene la secuencia completa de <i>cbrA</i> en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1350	Plásmido derivado de pUC18Sfi-miniTn7BB-Gm para hacer fusiones traduccionales a <i>gfpmut3</i> en el extremo C-terminal de proteínas. Clonación dirigida <i>SpeI/PstI</i> en el polilinker <i>SpeI-SmaI-BamHI-HindIII-SacI-XhoI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1353	Plásmido derivado de pMPO1350 que contiene el casete de expresión $lacI^q-P_{tac}$ clonado <i>SmaI/HindIII</i> obtenido por restricción de pIZ1016. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
pMPO1357	Fusión transcripcional $P_{cbrA}::lacZ$ en pMPO234 clonada <i>EcoRI/SmaI</i> con las (coord. -430 a +18 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	Esta tesis
pMPO1358	( $P_{tac-cbrA \Delta TM}'-gfpmut3$ ) Clonación en fase de una versión truncada de <i>cbrA</i> soluble en pMPO1353 digerido <i>HindIII/XhoI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
<b>pMPO1359</b>	( <i>P<sub>tac</sub>-cbrA'-gfpmut3</i> ) Clonación en fase de la secuencia silvestre de <i>cbrA</i> en pMPO1353 digerido <i>HindIII/XhoI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1367</b>	( <i>P<sub>cbrA</sub>-cbrA-ΔTM'-gfpmut3</i> ) Clonación en fase de la secuencia soluble de <i>cbrA</i> expresado bajo su propio promotor en pMPO1359 digerido <i>SpeI</i> (romo)/ <i>Sall</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1368</b>	Clonación de <i>cbrX</i> desfasado con la delección de un nucleótido T tras el primer ATG sin recuperar la pauta abierta de lectura, junto a la secuencia de <i>cbrA</i> completa en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1369</b>	Clonación de <i>cbrX</i> desfasado con la delección de un nucleótido T tras el primer ATG y la inserción de una C recuperando la pauta abierta de lectura, junto a la secuencia de <i>cbrA</i> completa en pME6182. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1370</b>	Fusión traduccional de <i>P<sub>cbrA</sub>'-lacZ</i> desde -421 a +249 del ATG clonada <i>EcoRI/XmaI</i> en pMPO200. Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1371</b>	Fusión traduccional de <i>P<sub>cbrA</sub>'-lacZ</i> con la mutación del ATG1 de <i>cbrX</i> a GCA, clonada <i>EcoRI/XmaI</i> en pMPO200 (coord. -421 a +249 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1372</b>	Fusión traduccional de <i>P<sub>cbrA</sub>'-lacZ</i> con la mutación del ATG2 de <i>cbrX</i> mutada a GAT, clonada <i>EcoRI/XmaI</i> en pMPO200 (coord. -421 a +249 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1373</b>	Fusión traduccional de <i>P<sub>cbrA</sub>'-lacZ</i> con la secuencia de <i>cbrX</i> mutada en ambos ATG, clonada <i>EcoRI/XmaI</i> en pMPO200 (coord. -421 a +249 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1374</b>	Fusión traduccional <i>P<sub>cbrA</sub>'-lacZ</i> con un desfase (-1) en la pauta abierta de lectura de <i>cbrX</i> , clonada <i>EcoRI/XmaI</i> en pMPO200 (coord. -421 a +249 al ATG). Ap <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> .	(Monteagudo-Cascales et al., 2019)
<b>pMPO1379</b>	Vector derivado de pMPO1350 al que se le ha delecionado el gen <i>gfpmut3</i> por restricción con <i>XhoI/PstI</i> . Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	Barroso, sin publicar
<b>pMRB1</b>	Vector de amplio espectro para fusiones transcripcionales a <i>gfpmut3::lacZ</i> . Ap <sup>r</sup> .	(Jimenez-Fernandez et al., 2015)
<b>pRK2013</b>	Plásmido auxiliar en conjugaciones. Replicón ColE1, Tra <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup> .	(Figurski & Helinski, 1979)
<b>pSET152</b>	Plásmido integrativo en <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i> que porta el gen de resistencia a apramicina ( <i>aac(3)IV</i> ) y secuencias <i>int-att</i> para la recombinación sitio-específica del bacteriófago φC31. Am <sup>r</sup> .	(Bierman et al., 1992)
<b>pSEVA421</b>	Plásmido de expresión pSEVA. <i>oriV</i> (RK2), Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> .	(Martínez-García et al., 2015)
<b>pSW-I</b>	Plásmido auxiliar de expresión de la endonucleasa específica I-SceI. Ap <sup>r</sup> .	(Wong & Mekalanos, 2002)
<b>pTXB1</b>	Vector de expresión de <i>E. coli</i> que contiene el dominio de unión inteína/quitina de <i>Mxe</i> .	New England Biolabs
<b>pUC18Sfi-miniTn7BB-Gm</b>	Plásmido derivado de pUC18Sfi que porta el transposón sintético miniTn7BB-Gm. Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	(Jimenez-Fernandez et al., 2015)

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pUTminiTn5-Km	Plásmido que porta el minitransposón miniTn5-Km. Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> .	(De Lorenzo et al., 1990)
pUX-BF13	Plásmido auxiliar en transposición; proporciona en <i>trans</i> las funciones de transposición del sistema Tn7. Mob <sup>+</sup> , ori R6K, Ap <sup>r</sup> .	(Bao et al., 1991)

### 3.1.3. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Tabla 5. Tabla de oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Diana
aadA-BamHI_fwd	ATCGGATCCTTGGGGTACAGTCTATGCCTC	<i>aadA</i>
aadA-XhoI_rev	TATCTCGAGTTATTTGCCGACTACCTTGGTG	<i>aadA</i>
ATGpep_fwd	CGAGGCCAGCGCATACATCTATC	<i>cbrX</i>
ATG2pep_fwd	CCCGGCCATCGATGACTGGTGGA	<i>cbrX</i>
ATGpep_rev	GATAGATGTATGCGCTGGCCTCG	<i>cbrX</i>
ATG2pep_rev	TCCACCAGTCATCGATGGCCGGG	<i>cbrX</i>
ATG1-Tpep_fwd	AGGCCAGCATGACATCTATCGT	<i>cbrX</i>
ATG1-Tpep_rev	ACGATAGATGTCATGCTGGCCT	<i>cbrX</i>
CbrABsmI_rev	CAGGAATGCGCCAGACACCCC	<i>cbrA</i>
CbrAcompIF	CCCAAGCTTAGAGGCTGATTTGCGCT	P <sub>cbrA</sub>
CbrAEcoRI_fwd	CAGGAATTCGCCACCCAGC	<i>cbrA</i>
CbrAEcoRI_rev	GGCGAATTCCTGCGGCGAGGC	<i>cbrA</i>
CbrAFecol	CCCGAATTCGTCATCCAGCGTCGTGACG	<i>gluQ</i>
CbrAfusionXhoI_rev	TATCTCGAGATTCTCTCGACGGTCTC	<i>cbrA</i>
CbrAintein-SpeI_rev	CGTAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCAATTCTCTCGACGG TCTCGAA	<i>cbrA</i>
CbrAL_rev	ATAGGATCCACCTGTGCCGGCCCTTTTCG	P <sub>cbrA</sub>
CbrAL1_fwd	ATAGAATTCGATCTACCGCTTTACCGACCG	<i>gluQ</i>
CbrAL1_rev	ATAGGATCCCAGCGTTCCGCCAAGGGTTTG	<i>cbrA</i>
CbrA-NdeI_fwd	GGTGGTCATATGCCGATGAGCTTTAGCCT	<i>cbrA</i>
CbrAR_fwd	TATGGATCCGCCAGATCCTTGACCAGACC	<i>cbrA</i>
CbrAR_rev	TTAAAGCTTCCACGTTGCCGTTTCGATATC	<i>cbrA</i>
CbrAsol_rev	TATGCATGCTCAATTCTCTCGACGGTC	<i>cbrA</i>
CbrAsol1_fwd	ATAAAGCTTAAATAGAGAATAGAACCAAAT AAGGAGGTCCCATGCCGATGAGCTTTAG	<i>cbrA</i>
CbrAsol2_fwd	ATAAAGCTTAAATAGAGAATAGAACCAAATAAGGAGGTCC CCATGCCGATGAGCTTTAG	<i>cbrA</i>
CbrATM-NcoI_rev	TATCCATGGGCCTTCCTGCAGTGGGGT	<i>cbrA</i>

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Diana
CbrATM-Ndel_fwd	GGTGGTCATATGGAATTCGCCACCCAGC	<i>cbrA</i>
CbrATMSD_fwd	ATAAAGCTTAAATTACCAAACAGACACCCGCGGAAAAACA AAATGCCGATGAGCTTTAG	<i>cbrA</i>
CEKG-2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNAGAG	miniTn5
CEKG-2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNACGCC	miniTn5
CEKG-2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNGATAT	miniTn5
CEKG-4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	miniTn5
crcZ49-1Q	AACGGCTCACGCACAATAAAA	<i>crcZ</i>
crcZ99-2Q	AATCAGTTAGCTGCGCCTCC	<i>crcZ</i>
GFPfusion_fwd	ATAACTAGTCCCGGGATCCAAGCTTAGAGCTCGAGAGTAA AGGAGAAGAAGCTTTTC	<i>gfpmut3</i>
L28-1	CCCACGCAAACAACAAAACC	<i>rpmB</i>
L28-2	TCGGATTCAACCCAGAAAACG	<i>rpmB</i>
mTn5maplr	AGCTTGCTCAATCAATCAC	miniTn5
O-long	CGGCCGCACTTGTGTATAAGAGTC	Región O de miniTn5
PcbrAEcoRI_fwd	ATAGAATTCCACGGTGCCAGAGGCTG	<i>P<sub>cbrA</sub></i>
PcbrAlongSma_rev	TATCCCGGGCAGGAATGCGCCAGACACCC	<i>cbrA</i>
PcbrASma_rev	TATCCCGGGGCTAAAGCTCATCGGCATCT	<i>cbrA</i>
Pep3+C_fwd	TACCTGCTCTGGCCTGATCCTGATCG	<i>cbrX</i>
Pep3+C_rev	CGATCAGGATCAGGCCAGAGCAGGTA	<i>cbrX</i>
PstI_gfp_rev	AAAAAACTGCAGATTATTTTATTTGTATAGTTCATCCATGC	<i>gfpmut3</i>
rrn-f27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	ARNr 16S
rrn-r519	GTATTACCGCGGCTGCTG	ARNr 16S
RT-CbrA_fwd	GTACCTCATGGTGCTGTTCCG	<i>cbrA</i>
RT-CbrA_rev	TAACAGGCAAGGAAGCCGTA	<i>cbrA</i>
RT-cbrX_fwd	ATGTACATCTATCGTTTGGTCC	<i>cbrX</i>
RT-cbrX_rev	CTAAAGCTCATCGGCATCTCGTT	<i>cbrX</i>
RT-PcbrXA_fwd2	AGCCCGTAGCGCCCAACC	<i>P<sub>cbrA</sub></i>
SigXL_KpnRv	TAAGGTACCAACGGATCTGGCCGACAGTC	<i>cmpX</i>
SigXL_SacFw	ATTGAGCTCTGGCAAGATCGTCTATTGGTTCCG	<i>cmpX</i>
SigXR_BamRv	TAAGGATCCGGAGCAGCTTCAGCTTGCTTC	<i>oprF</i>
SigXR_KpnFw	TAAGGTACCTAGTGGCGTGCAAATATCTCTAACGAAC	<i>oprF</i>
Tn7Glms	AATCTGGCCAAGTCGGTGAC	<i>glmS</i>
Tn7R109	CAGCATAACTGGACTGATTTTCAG	Extremo R Tn7



### 3.1.4. Medios y condiciones de cultivo

*P. putida* se cultivó en medio mínimo M9 preparado a partir de las siguientes mezclas concentradas: tampón fosfato salino, una solución de microelementos y vitaminas (ver abajo). Como fuente rica de carbono se utilizó succinato sódico 20 mM y como fuente rica de nitrógeno cloruro de amonio 1 g/L. Como fuentes limitantes de carbono se usaron citrato, glucosa, histidina y oxalacetato 20 mM. Como medio rico se usó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 2000) con distintas adiciones. Cuando se requirió usar un medio sólido se le añadió 15 g/L de agar bacteriológico (Panreac) al correspondiente medio de cultivo.

El crecimiento de los cultivos se realizó en tubos o matraces con agitación a 180 rpm a una temperatura de 30 °C y 37 °C, para *P. putida* y *E. coli* respectivamente. Cuando fue necesario se añadieron los siguientes antibióticos para asegurar el mantenimiento de plásmidos o selección de marcadores cromosómicos: Ampicilina (Ap) 100 mg/L, carbenicilina (Cb) 500 mg/L, kanamicina (Km) 25 mg/L, tetraciclina (Tc) 5 mg/L (para *E. coli*), 10 mg/L (para *P. putida*), rifampicina (Rif) 20 mg/L, cloramfenicol (Cm) 15 mg/L, gentamicina 10 mg/L, estreptomina (Sm) 50 mg/L y apramicina (Am) 30 mg/L. Para la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio sólido se empleó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) a una concentración final de 25 mg/L. Cuando fue necesario inducir la expresión de genes expresados desde el casete de regulación *lacI<sup>P</sup>-P<sub>tac</sub>*, se adicionó al cultivo isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1 mM. Todos los reactivos se adquirieron de la casa comercial Sigma-Aldrich. La contraselección del gen *sacB* se llevó a cabo en medio LB-agar añadiendo sacarosa al 10 % (p/v).

Tampón fosfato salino (para una solución 10 veces concentrada): 70 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 28 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L de NaCl. Autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

Microelementos (para una solución 500 veces concentrada): 50 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 5 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3.2 g/L de  $\text{ZnCl}_2$ , 0.33 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.18 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.15 g/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 3.25 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5 g/L de EDTA y 73 mL de HCl al 37 %. Filtrados y conservados a temperatura ambiente.

Vitaminas (para una solución 100 veces concentrada): 10 mg/L de tiamina-HCl, 4 mg/L de ácido fólico, 20 mg/L de nicotinamida, 20 mg/L de piridoxina-HCl. Esterilizado por filtración y conservado a 4 °C.

Fuentes de carbono (Scc, OAA, Cit, His, Glu): Preparados a 1 M, filtrados y conservados a temperatura ambiente.

Fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ): Preparado a 100 g/L, autoclavado y conservado a temperatura ambiente.

LB: Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L.

### 3.1.5. Ensayos de viabilidad celular

#### 3.1.5.1. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria (MIC, en inglés *Minimum Inhibitory Concentration*) viene definida como la concentración más baja de una sustancia capaz de inhibir completamente el crecimiento microbiano transcurridas 24 h. La cuantificación de la actividad *in vivo* de agentes antimicrobianos como antibióticos, se ha evaluado a través de dos métodos de dilución: dilución en gota en medio sólido y dilución en placas multipocillos.

##### 3.1.5.1.1. Diluciones en gota en medio sólido

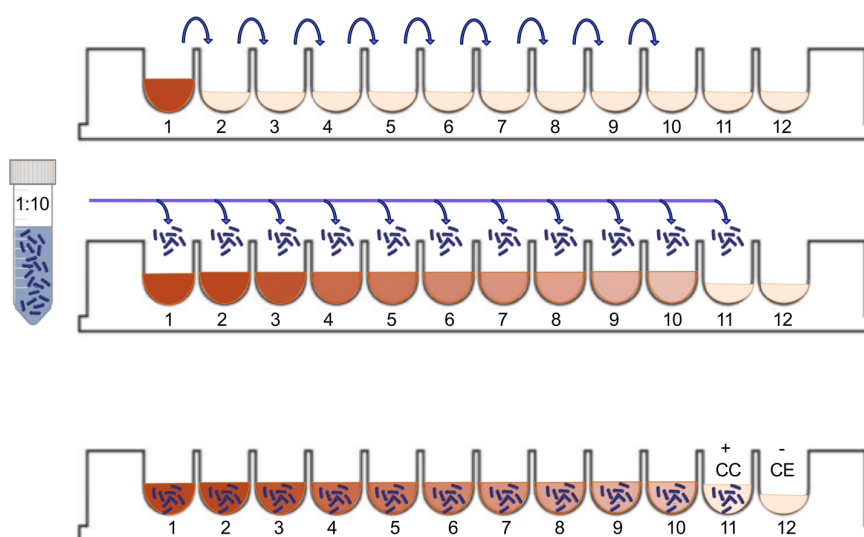
El método de dilución en gota en medio sólido permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos en cada placa con una cierta concentración del compuesto antimicrobiano. Para caracterizar la resistencia a diferentes concentraciones del antibiótico estreptomicina de las estirpes silvestre MPO540, el mutante  $\Delta crc$  (MPO548) y los mutantes derivados de la mutagénesis por transposición de miniTn5-Km, se establecieron cultivos en medio LB crecidos durante toda la noche a 30 °C y 180 rpm. Los cultivos se diluyeron hasta  $A_{600} = 0.05$  en medio fresco LB y se incubaron hasta alcanzar una  $A_{600} = 0.2-0.3$ . Entonces, se hicieron diluciones seriadas de  $10^1$  a  $10^5$  en 1 mL de tampón fosfato salino 1X y se sembraron gotas de 10  $\mu$ L del cultivo en placas de LB que contenía estreptomicina en un rango comprendido entre 25-200  $\mu$ g/mL de concentración final. Las diluciones finales en placa fueron de  $10^2$  a  $10^5$ . Todas las placas se incubaron a 30 °C toda la noche y se observó cualitativamente la diferencia de crecimiento de cada una de las estirpes en las distintas concentraciones del antibiótico. Se hicieron al menos 3 réplicas biológicas de cada estirpe.

##### 3.1.5.1.2. Diluciones en placas multipocillos

La determinación de la concentración mínima inhibitoria a estreptomicina de las distintas estirpes mutantes obtenidas por transposición de miniTn5-Km (MPO951, MPO952, MPO953, MPO954, MPO955, MPO956, MPO957, MPO958, MPO960, MPO962, MPO963, MPO964, MPO966, MPO967, MPO968, MPO969, MPO970, MPO972) así como de la estirpe silvestre (MPO540) y mutante  $\Delta crc$  (MPO548), se basó en el procedimiento de diluciones seriadas en líquido establecido por la organización internacional *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Wiegand et al., 2008). En primer lugar, se inocularon 3 cultivos en medio Mueller Hinton (MH) sin antibiótico de 3 colonias por cada estirpe y se

incubaron toda la noche a 30 °C en agitación. A partir de cultivos saturados, se diluyeron a una  $A_{600} = 0.05$  en medio fresco y se incubaron hasta alcanzar una  $A_{600} = 0.1$  aproximadamente ( $10^8$  ufc/mL).

En las placas multipocillos que contenían 96 pocillos (12 mm x 8 mm, Costar 96 Corning) se preparó un total de 10 diluciones seriadas en medio MH con el antibiótico estreptomicina en un rango entre 800–1.5  $\mu\text{g/mL}$ . En los dos últimos pocillos se establecieron un control positivo de crecimiento (CC) con medio MH sin adicionar antibiótico e inoculado así como un control negativo de esterilidad (CE) constituido por medio MH sin adicionar antibiótico y sin inocular. Las placas multipocillos se prepararon dispensando 200  $\mu\text{L}$  de medio MH con el antibiótico al doble de la concentración final deseada para el primer pocillo. En el resto de pocillos se dispensó con micropipetas multicanal 100  $\mu\text{L}$  de medio MH y se fue transfiriendo 100  $\mu\text{L}$  del primer pocillo al décimo pocillo realizando de este modo diluciones seriadas de orden 2. A continuación, se diluyó 100 veces el cultivo bacteriano ( $10^6$  ufc/mL) y se inoculó 100  $\mu\text{L}$  en todos los pocillos excepto en el control de esterilidad (Figura 16).



**Figura 16. Diagrama del proceso de determinación de la MIC por el método de dilución en gotas.**

Se representa el perfil de una placa de 96 pocillos donde se realiza la determinación de la MIC. En primer lugar, se inocula el pocillo 1 con el antibiótico a la concentración 2X de su concentración final y los pocillos 2-12 con medio MH sin antibiótico. A continuación, se realizan diluciones seriadas del antibiótico desde el pocillo 1 al 10 (arriba), seguido de la inoculación de un cultivo bacteriano diluido 1:10 en los correspondientes pocillos (1-11) (centro) y el resultado final tras la inoculación (abajo). Los pocillos 11 y 12 corresponden al control positivo de crecimiento (CC, +) y control negativo de esterilidad (CE, -), respectivamente.

Una vez inoculada la placa, se selló con adhesivo los laterales de la placa para evitar la evaporación del medio de cultivo durante la incubación a 30 °C en agitación durante 24 h. Se midió a tiempo inicial ( $T_0$ ) y tiempo final ( $T_f$ ) en el lector de multiplacas POLARstar Omega (BMG Labtech). Finalmente, el valor de la MIC se consideró a la concentración de aquel pocillo que no experimentó cambio de color o turbidez, es decir, ausencia de crecimiento bacteriano.

Medio MH: Sólidos de infusión de carne 2 g/L, almidón 1.5 g/L, hidrolizado de caseína 17.5 g/L (pH 7.4). Disolver 21 g/L, autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

### **3.1.5.2. Determinación de la frecuencia de resistencia espontánea a estreptomicina**

Antes de realizar un ensayo de mutagénesis por transposición para *Pseudomonas putida*, se determinó el rango de selección del antibiótico correspondiente cuantificando en primer lugar la frecuencia de aparición de mutantes espontáneos resistentes al antibiótico para las estirpes silvestre (MPO536) y mutante  $\Delta crc$  (MPO537). Para ello se sembraron diluciones seriadas en placas de LB con Sm a 50  $\mu\text{g/mL}$  (diluciones de  $10^2$  a  $10^4$ ) para estimar el número de resistentes espontáneos, en LB (diluciones de  $10^4$  a  $10^7$ ) para estimar el número de células viables.

La frecuencia de espontáneos a estreptomicina se calculó como el ratio entre el número de espontáneos a Sm<sup>50</sup> y el número de células totales viables.

### **3.1.6. Ensayo de movilidad en agar blando**

El ensayo de movilidad por *swimming* se realizó según (Rashid & Kornberg, 2000; Robleto et al., 2003) empleando placas de medio rico LB con agar de alta pureza al 0.3 % (Difco agar noble (BD Diagnostics)). Se inoculó una colonia de cada estirpe con un asa de siembra estirada atravesando ligeramente el agar, desde una placa de LB agar 1.5 % crecida el día anterior. Las placas resultantes se incubaron a 30 °C durante 20 horas. La movilidad se cuantificó midiendo el diámetro de la circunferencia de crecimiento y se expresó como porcentaje de movilidad relativa a la estirpe silvestre, con su correspondiente desviación estándar. Se realizaron un total de al menos 5 réplicas biológicas por estirpe.

### 3.1.7. Conservación de estirpes bacterianas

En el proceso de conservación a largo plazo, las distintas estirpes se congelaron en medio LB líquido con glicerol al 15 % (v/v) y se mantuvieron congeladas a -80 °C.

### 3.1.8. Estimación del tiempo de generación

El tiempo de generación para el crecimiento se calculó como la pendiente de la recta correspondiente a la fase exponencial del crecimiento microbiano ( $A_{600}$ ) en escala semilogarítmica según Fiedrich Widdel (2010).

## 3.2. Manipulación de ácidos nucleicos

### 3.2.1. Preparación de ADN cromosómico

Las extracciones de ADN cromosómico de *P. putida* se realizaron con el kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de 1 a 5 mL de un cultivo saturado en medio LB.

### 3.2.2. Preparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizaron siguiendo dos procedimientos distintos, en función de futuras aplicaciones. Para la obtención de ADN de bastante pureza, destinado a su secuenciación o a digestión enzimática con el fin de realizar una clonación, se usó el kit Nucleospin Plasmid Mini (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el resto de las aplicaciones se usó el protocolo simplificado de lisis alcalina (Stephen et al., 1990). El sedimento de células procedente de 3 mL de un cultivo saturado en LB se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución y se incubó 5 min en hielo. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de solución II recién preparada, mezclando por inversión e incubando 5 min en hielo. Luego se añadieron 150  $\mu$ L de solución III, y se mezcló por inversión, incubándose al menos otros 5 min en hielo. Los restos celulares se eliminaron por sedimentación centrifugando durante 10 min a 16100 g y el ADN presente en el sobrenadante se precipitó añadiendo 1 volumen de etanol 96 % a -20 °C, y centrifugando inmediatamente durante 10 min a 16100 g. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70 % frío, y se centrifugó 2 min a

16100 g. Dicho precipitado se secó al vacío y se resuspendió en TER. Las preparaciones de plásmidos se almacenaron a -20 °C.

GTE: Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8).

Solución II: NaOH 0.2 N, SDS 1 % (p/v). Preparar fresca.

Solución III: Acetato potásico 3 M ajustado a pH 4.8 con ácido fórmico.

TER: Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), ribonucleasa (Roche) 0.02 % (p/v).

### 3.2.3. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el fin de amplificar fragmentos de ADN para su posterior clonación, se realizaron reacciones de PCR empleando como molde el ADN correspondiente. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL en tubos de 0.2 mL, en presencia de los oligonucleótidos adecuados a una concentración de 1 mM, dNTPs a 100 µM y 1 unidad de ADN polimerasa termorresistente de alta fidelidad (*Phusion High-Fidelity*, Thermo Scientific), en el tampón Hi-Fi 5X que suministra la casa comercial, que contiene MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM proporcionando una concentración final de 1.5 mM. Según el caso, se empleó como molde 50 ng de ADN cromosómico de *P. putida* o *E. coli* o bien, 10 ng de ADN plasmídico.

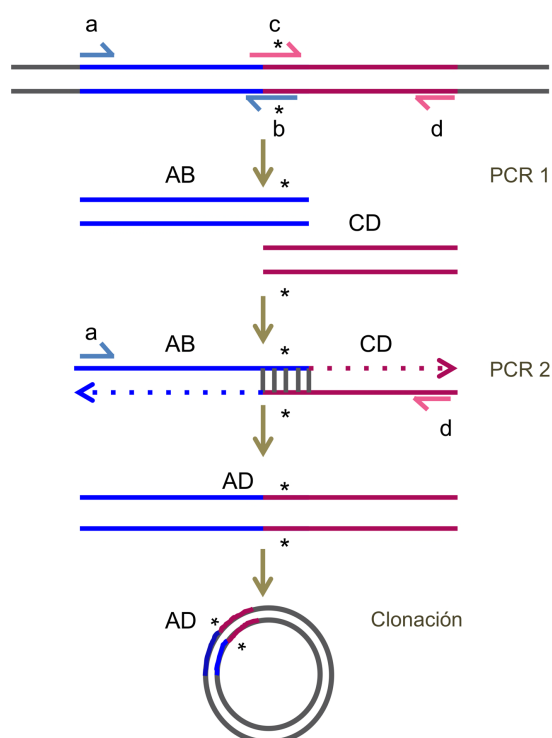
El programa de PCR del termociclador varió en función del tamaño y naturaleza del fragmento a amplificar, pero en líneas generales consistió en:

- a) Desnaturalización inicial: 2 min a 98 °C
- b) 30 ciclos:
  - Etapa de desnaturalización: 30 s a 94 °C
  - Etapa de anillamiento: 30 s entre 45-72 °C (temperatura variable en función de la temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) de los oligonucleótidos)
  - Etapa de extensión: 30 s por kilobase de ADN a amplificar a 72 °C
- c) Extensión final: 5 min a 72 °C

### 3.2.4. PCR solapante

La técnica de PCR solapante se empleó para generar mutaciones que no tenían en sus proximidades alguna diana de restricción que pudiera ser utilizada para sustituir un fragmento de ADN silvestre por uno mutante mediante digestión. La PCR solapante consta de dos fases

esquematisadas en la figura 17 y se realizó en base al método descrito por (Camacho & Casadesús, 2005). En una primera fase se realizan dos PCR independientes, cada una con un oligonucleótido externo a la región a amplificar, y uno interno que contiene la mutación a insertar (Figura 17, PCR 1). Cada oligonucleótido interno contiene las mutaciones centradas en su secuencia flanqueadas por unos 10 nucleótidos de secuencia silvestre, siendo los dos oligonucleótidos mutagénicos complementarios entre sí. Los fragmentos resultantes de la amplificación se purificaron según su tamaño en un gel de agarosa.



**Figura 17. Esquema de una PCR solapante.** Las flechas con el símbolo \* sobre ellas representan los oligonucleótidos internos que contienen las mutaciones (b y c), mientras que las flechas a y d representan los oligonucleótidos externos. Esquema adaptado de (Heckman & Pease, 2007).

En una segunda fase, los dos fragmentos amplificados se diluyeron en cantidades equimolares y se mezclaron sirviendo como moldes para una segunda PCR en la cual los cebadores iniciales fueron los dos oligonucleótidos más externos (Figura 17, PCR 2). En este caso, la amplificación se realizó en dos pasos consistentes en 10 ciclos iniciales de enriquecimiento del molde mutante con una temperatura de hibridación más alta para favorecer la extensión desde la zona solapante (donde se encuentra la mutación), y otros 25 ciclos a una temperatura de hibridación más baja para favorecer la extensión desde los cebadores externos y obtener cantidades suficientes de producto final mutado. Finalmente,

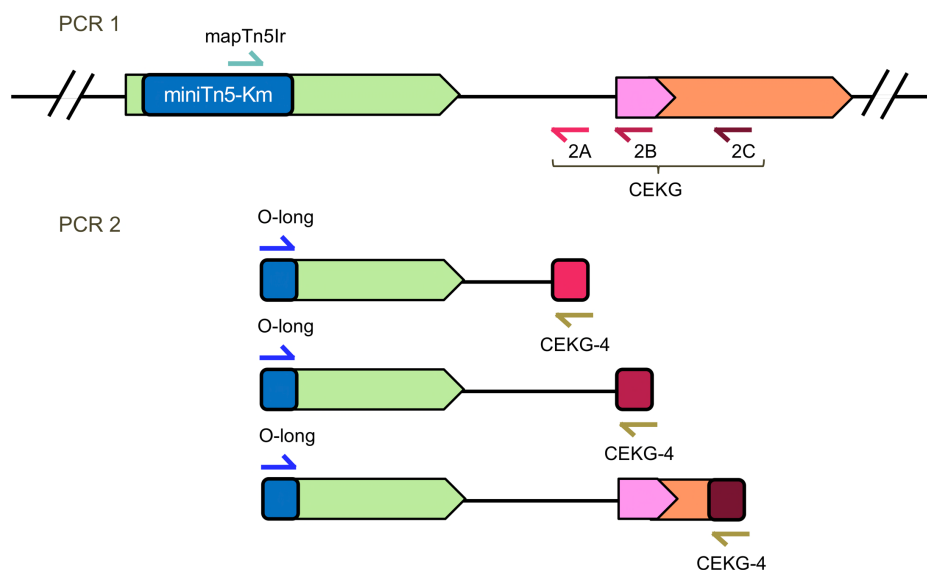
este producto de PCR solapante se purificó de un gel de agarosa, se clonó en el vector correspondiente y se comprobó por secuenciación que el ADN había incorporado la mutación.

### **3.2.5. Mapeo de inserciones de miniTn5-Km mediante PCR de cebadores arbitrarios**

Para mapear las inserciones del transposón miniTn5-Km se empleó el método de PCR con cebadores arbitrarios descrito por (O'Toole et al., 1999) pero con algunas modificaciones. En la primera ronda de PCR se usó como molde el ADN genómico del mutante con el transposón insertado. Inicialmente, para enriquecer los fragmentos que albergan los extremos del transposón, se utilizó el oligonucleótido mapTn5lr que hibrida en ambos extremos del transposón durante 10 ciclos. Posteriormente, se añadió a la reacción una mezcla de oligonucleótidos arbitrarios CEKG-2A, CEKG-2B y CEKG-2C y se sometió a 6 ciclos de PCR con una  $T_m$  de 42 °C y una disminución de 1 °C en cada ciclo. Las secuencias de estos oligonucleótidos arbitrarios contienen una secuencia compartida de 20 nucleótidos en su extremo 5', 10 nucleótidos aleatorios en la porción central y una secuencia de 4 o 5 nucleótidos específicos en su extremo 3'. Los pasos finales de la primera ronda de PCR se llevaron a cabo como una reacción estándar de 30 ciclos con una  $T_m$  de 56 °C.

En la segunda ronda de PCR se usó como ADN molde una dilución de 10 veces de los productos de PCR obtenidos en la primera ronda. Las condiciones de la segunda ronda de amplificación fueron las de una PCR estándar con una  $T_m$  de 57 °C y se usó como oligonucleótidos O-long que hibrida en una secuencia aguas abajo de mapTn5lr en los extremos del transposón, y CEKG-4, que porta la secuencia compartida en los extremos 5' de los tres oligonucleótidos arbitrarios CEKG-2 [A, B, C] (Figura 18).





**Figura 18. Mapeo de inserciones del transposón miniTn5-Km mediante PCR con cebadores arbitrarios.** En la primera ronda de PCR (PCR1) se empleó ADN genómico de los mutantes de inserción y los oligonucleótidos mapTn5lr, CEKG-2A, CEKG-2B y CEKG-2C generando fragmentos de PCR de diferentes tamaños. En la segunda ronda de PCR (PCR2) se empleó los productos obtenidos en la PCR1 y se amplificó con los oligonucleótidos O-long y CEKG-4.

Los productos de PCR se purificaron con el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), se secuenciaron usando O-long como oligonucleótido y sus secuencias correspondientes se compararon con la base de datos mediante BLASTn. En cada secuencia, se identificó el final del transposón miniTn5-Km así como la secuencia adyacente del genoma de *P. putida* KT2442, localizando de este modo el punto de inserción.

### 3.2.6. Electroforesis de ADN

Para separar el ADN en función del peso molecular y visualizar fragmentos lineales se empleó la técnica de electroforesis en gel. Si el fragmento de interés era superior a 100 pb se utilizaron geles de agarosa de baja electroendoósmosis, cuya concentración osciló entre 0.7 % y 2 % dependiendo de los tamaños a separar, en tampón TAE 1X. Estos geles se sometieron a una diferencia de potencial fija de entre 90 y 120 V. Por el contrario, si el fragmento de interés era inferior a 100 pb se usaron geles verticales no desnaturizantes de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1), cuya concentración varió entre el 5 % y el 8 % para una mejor resolución en función del tamaño del fragmento, en tampón TBE 0.5X. En este caso los geles se sometieron a una intensidad de corriente fija de 30 mA. En ambos casos,

se utilizó el marcador de peso molecular comercial GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Antes de cargar las muestras en el gel, se mezclaron con 1/6 del volumen final de tampón de carga. Después de la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio 1 mg/L y las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de radiación ultravioleta (Vilber Lourmat), se fotografiaron y cuantificaron con una cámara acoplada a una impresora de impresión térmica.

Tampón TAE 1X: Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, (pH 7.7).

Tampón TBE 0.5X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, (pH 8.3).

Tampón de carga: Tris-HCl 10 mM (pH 8), Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM (pH 8), glicerol 30 % (v/v), azul de bromofenol 0.25 % (p/v), xylene cyanol 0.25 % (p/v).

### 3.2.7. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN

El ADN resuelto mediante un gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y los fragmentos se identificaron mediante visualización con un transiluminador de radiación ultravioleta de baja energía y se aislaron recortando los mismos del gel con un bisturí. En la purificación del ADN contenido en geles de agarosa, se utilizó el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2.8. Clonación de fragmentos de ADN en plásmidos

La clonación de fragmentos de ADN se realizó esencialmente tal cual está descrito en (Sambrook et al., 2000). Los fragmentos de ADN, procedentes de una reacción de PCR o de un plásmido, se cortaron con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso (procedentes de las compañías Roche, New England Biolabs o Thermo Scientific), en el correspondiente tampón de reacción suministrado por el fabricante. Cuando fue necesario, se rellenaron los extremos 5' protuberantes con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa (New England Biolabs), y se eliminaron los extremos 3' protuberantes con la ADN polimerasa del fago T4 (New England Biolabs). Posteriormente, tras purificar los fragmentos deseados del gel de agarosa como se ha descrito anteriormente y cuantificarlos, se mezclaron para realizar una reacción de ligación en tampón ligasa suministrado por la casa comercial. Cada ligación se realizó en un volumen final de 10 µL en presencia de 1 unidad de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), y se incubó al menos 2 h a temperatura ambiente (25 °C). Finalmente se transformó la estirpe *E. coli* DH5α competente (según el método citado en el apartado 3.2.11) con la mezcla de ligación, y se sembró, junto al correspondiente control de religación, en placas de medio rico que contenía el antibiótico que portaba el plásmido correspondiente. Si

el fragmento clonado provenía de una amplificación por PCR, los clones obtenidos se comprobaron por restricción y posterior secuenciación. Tras seleccionar el clon correcto, se procedió a la congelación a -80 °C de la estirpe de *E. coli* que lo contenía por duplicado en la colección de estirpes del laboratorio.

Tampón Ligasa de T4: Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, (pH 7.5).

### 3.2.9. Transferencia de plásmidos por conjugación

La transferencia de plásmidos desde *E. coli* a *P. putida* se llevó a cabo por conjugación triparental, empleando para ello la estirpe de *E. coli* DH5α con el plásmido auxiliar pRK2013 (Figurski & Helinski, 1979) a partir de cultivos saturados crecidos en medio LB. Se tomó 1 mL de cada estirpe (donadora de *E. coli*, la receptora de *P. putida* y la estirpe auxiliar), se lavaron con LB fresco para eliminar los antibióticos de los medios de cultivo, y se hizo una mezcla con 0.1 mL de cada estirpe. Esta mezcla se centrifugó, se descartó la mayor parte del sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en el volumen residual de medio, aproximadamente 20 µL. Las células resuspendidas se depositaron en forma de gota (parche de conjugación) en una placa de LB sólido, se dejaron secar en una campana de flujo laminar y posteriormente se incubaron durante 7-8 h a 30 °C. Por último, se segregó parte del parche en una caja de LB con los antibióticos adecuados para la selección de la transferencia del plásmido y X-gal si el plásmido contenía el gen *lacZ*.

### 3.2.10. Obtención de células competentes

Para la transformación de *E. coli* DH5α con mezclas de ligación o plásmidos, las células se hicieron competentes según (Inoue et al., 1990). Con dicho método se consigue una alta frecuencia de transformación (hasta 10<sup>9</sup> transformantes por µg de ADN plasmídico) y además permite la conservación de las células competentes a -80 °C por un prolongado espacio de tiempo sin una disminución importante de la competencia.

Para la transformación con plásmidos de otras estirpes de *E. coli* (como las estirpes ER2566 y BL21 (DE3) pLysS), las células se hicieron competentes mediante el tratamiento con TSS (*Transformation and Storage Solution*) (Chung et al., 1989), lo cual implica la transformación inmediata de las células competentes pues no se pueden conservar. En este caso, para cada transformación, se recogieron las células procedentes de 1 mL de cultivo de la estirpe receptora cuando alcanzó una A<sub>600</sub> de 0.3-0.6, y se resuspendieron en 75 µL de LB frío. Tras una incubación a 4 °C durante 5 min para enfriar las células, se añadieron 75 µL de

TSS 2X frío, se mezcló suavemente y se incubó de nuevo 5 min a 4 °C, estando las células entonces listas para ser transformadas.

TSS 2X: Triptona 0.8 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 85.5 mM, PEG-8000 25 mM, DMSO 10 % (v/v), MgSO<sub>4</sub> 100 mM, (pH 6.5).

### 3.2.11. Transferencia de plásmidos por transformación mediante choque térmico

Se mezclaron 50 µL de células competentes con 500 ng de preparación de plásmido o, en su caso, 10-15 µL de mezcla de ligación y se incubaron 30 min a 4 °C para la correcta adsorción a la superficie celular. Después se sometieron a un choque térmico de durante 40 s a 42 °C, se enfriaron rápidamente en hielo y se les añadió 1 mL de SOC. Finalmente, se incubaron a 37 °C durante 60- 90 min para que el antibiótico se exprese, se sembraron en placas de medio selectivo y se incubaron toda la noche a dicha temperatura.

Medio SOB: Triptona 2 % (p/v), extrato de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 8.5 mM, KCl 1.25 mM. Ajustar el pH a 7 con NaOH y autoclavar. Añadir posteriormente MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

Medio SOC: Medio SOB suplementado con glucosa 0.36 mM.

### 3.2.12. Transferencia de plásmidos por electroporación

Para la transformación de plásmidos por electroporación se añadieron entre 100 y 500 ng de plásmido en un volumen no superior a 10 µL, y 100 µL de células electrocompetentes de *P. putida* descritas en el apartado 3.2.10. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación con una distancia de 0.2 mm entre los electrodos preenfriadas a -20 °C, y se dio un pulso según el protocolo Ec2 de un electroporador Micropulser™ (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso, se añadió 1 mL de SOC para la reconstitución rápida de las membranas celulares, se homogenizó la mezcla y se transfirió a un tubo eppendorf que se incubó 1-2 horas a 30 °C en agitación.

Con objeto de integrar fragmentos en el cromosoma de *P. putida* mediante el sistema de transposición Tn7 (Lambertsen et al., 2004), se procedió de forma similar pero se usó 1 µg del plásmido donador del fragmento (derivado del pME6182 o pUC18Sfi-miniTn7BB-Gm, que contiene las resistencias a Gm y Ap), 1 µg del plásmido helper pUX-BF13 (contiene la transposasa y la resistencia a Ap) y 100 µL de células electrocompetentes. La integración estable del fragmento contenido entre ambos extremos del transposón (Tn7R y Tn7L) se produce en un sitio único del cromosoma aguas abajo del gen *glmS* (PP5499) en *P. putida*. La mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 0.2 mm de paso, se aplicó un pulso

eléctrico y se añadió 1 mL de SOC. A continuación, se incubó 2 horas a 30 °C en agitación, se hicieron diluciones de la mezcla y se sembraron en placas de LB con los antibióticos adecuados para la selección de la integración del fragmento. Para comprobar los candidatos integrados correctamente en el cromosoma de *P. putida*, se analizaron mediante amplificación por PCR de colonias con un oligonucleótido que hibridaba dentro de la secuencia del transposón (Tn7R109) y otro dentro del gen *glmS* (Tn7Glms), amplificando un fragmento de 150 pb si la integración era correcta.

### 3.2.13. Secuenciación de ADN

La secuenciación de los plásmidos para confirmar la secuencia clonada fue llevada a cabo por la empresa STAB VIDA (Portugal). Las lecturas obtenidas se compararon con las bases de datos mediante la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997) disponible en la página web del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 3.2.14. Preparación de ARN total

Las extracciones de ARN se realizaron según (Garcia-Gonzalez et al., 2005) con algunas modificaciones. En cada extracción se partió de biomasa correspondiente a 10 mL de cultivo a  $A_{600} = 0.4$  en los medios oportunos. Cuando los cultivos alcanzaron la densidad óptica adecuada, se recogieron las células en alícuotas de 2 mL por centrifugación en frío y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas se guardaron a -80 °C hasta el momento de ser procesadas. Posteriormente, cada alícuota se resuspendió en 0.5 mL de TriPure Isolation Reagent (Roche), que contiene fenol e isocianato de guanidinio, y se incubaron un tiempo mínimo de 10 min a 60 °C para lisar las células. Tras juntar las alícuotas dos a dos, se centrifugaron 10 min a 16100 *g* y a 4 °C para separar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió entonces a tubos de Phase Lock Gel (Eppendorf) precompactados al cual se les añadió 200 µL de cloroformo, se agitaron por inversión y se incubaron a 4 °C durante 15 min. Después se centrifugaron a 16100 *g* durante 15 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se extrajo mediante la adición de 400 µL de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) al mismo tubo y su posterior centrifugación a 16100 *g*, 5 min a 4 °C. La muestra se transfirió entonces a un nuevo tubo y se precipitó con 1 volumen de isopropanol durante 10 min a 4 °C. Tras un lavado con etanol 70 % preenfriado se secaron los precipitados en vacío y se resuspendieron en un volumen de 100 µL de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC; compuesto que inactiva las ARNasas).

Para los ensayos de PCR cuantitativa, se realizó un tratamiento con ADNasa I para eliminar posibles trazas de ADN utilizando para ello el kit Turbo DNA Free (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras se limpiaron una vez más, eliminando gran parte del ARN ribosómico 5S con RNeasy mini kit (Qiagen), usando el protocolo Clean Up y eluyendo cada muestra en 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  del kit (ARNase free). Las muestras de ARN se cuantificaron en el NanoDrop y se visualizaron en gel de agarosa para verificar la cuantificación y comprobar su integridad. Para descartar la presencia de ADN contaminante se llevó a cabo una PCR con 500 ng de ARN como molde y oligonucleótidos que amplificaban regiones de genes de alta expresión, como son el gen del ARN 16S o el de la proteína ribosómica L28 de la subunidad 50S (L28-1 y L28-2). Las muestras de ARN fueron guardadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas para un uso a corto plazo o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para largo plazo.

### 3.2.15. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para cuantificar las distintas preparaciones de ADN de doble cadena (ADN plasmídico, fragmentos de ADN purificados, ADN total, etc.) se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y se calculó la concentración aplicando un coeficiente de extinción de  $50\text{ ng cm } \mu\text{L}^{-1}$ . En el caso de las muestras de ARN, las medidas se efectuaron de la misma forma, pero aplicando para el cálculo un coeficiente de extinción de  $40\text{ ng cm } \mu\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.16. Análisis por *Southern blotting*

#### 3.2.16.1. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina

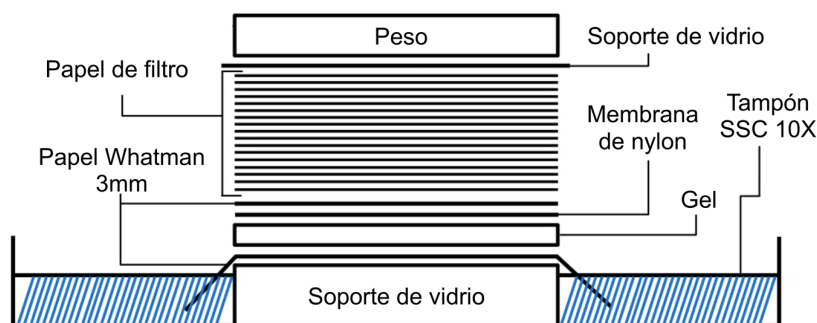
Las sondas de ADN empleadas consistieron en fragmentos de restricción o de PCR aislados de geles de agarosa. En el marcaje de las sondas de ADN se empleó el método no radiactivo de la digoxigenina dUTP (deoxiuridín nucleósido trifosfato) siguiendo el método de cebado aleatorio o *random priming* en base a las instrucciones del proveedor.

Tras digerir y purificar las sondas, se marcaron con digoxigenina empleando 2  $\mu\text{L}$  de Dig Labelling mix 10X (Roche), 2  $\mu\text{L}$  de Hexanucleotide mix 10X (Roche) y 1 U de enzima Klenow (Roche) en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  e incubando la mezcla toda la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Como protocolo alternativo se realizó la propia reacción de PCR en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  con 2.5  $\mu\text{L}$  de Dig Labelling mix 10X (Roche) y se purificó la banda tras migrar los productos en un gel de agarosa.

### 3.2.16.2. Hibridación de sondas de ADN (*Southern blotting*)

Para la comprobación de los mutantes MPO493 y MPO494 por *Southern blotting* se sintetizó por PCR una sonda flanqueante al gen *cbrA* que se denominó *cbrAL* empleando los oligonucleótidos *CbrAFecoL/ CbrAL\_rev* y siguiendo el protocolo de PCR descrito en el apartado 3.2.3. Los productos de PCR se purificaron de un gel de agarosa 1 % con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). El marcaje de las sondas con digoxigenina se llevó a cabo según se describió en el apartado 3.2.16.1.

Se digirieron 6 µg de ADN cromosómico de las distintas estirpes con las enzimas *BamHI/SalI/EcoRI/HindIII* usando 2 µL de enzima (Roche) de cada una e incubando 16 horas a 37 °C en un volumen final de 50 µL. Se separó el ADN digerido en función de su tamaño en un gel de agarosa 0.7 % (p/v) migrado a 45 V a 4 °C durante toda la noche. En primer lugar, se aplicaron las soluciones de despurinización (20 min) para favorecer la fragmentación del ADN, desnaturalización (30 min) y neutralización (2 x 15 min) realizando lavados con agua destilada entre cada paso. Posteriormente, la transferencia del ADN desde el gel de agarosa a la membrana de nailon Hybond N<sup>+</sup> (GE Healthcare) se realizó usando el sistema de transferencia semi-seca en pirámide con SSC 10X y mecha papel Whatman (3 mm espesor), durante toda la noche a temperatura ambiente como se muestra en la figura 19.



**Figura 19. Esquema del sistema de transferencia en pirámide de ADN a membrana por capilaridad.** El gel con el ADN fragmentado por las enzimas de restricción se colocó sobre una superficie de vidrio con una mecha de papel de filtro Whatman y sobre éste se colocó la membrana de nylon junto a sucesivas capas de papel de filtro y papel toalla. En la parte superior se colocó un soporte de vidrio y sobre él algún objeto pesado.

La membrana se lavó con SSC 2X, se secó por completo y se procedió a fijar mediante *crosslink* por irradiación con luz ultravioleta a 700 V durante al menos 30 segundos. Se comprobó la transferencia por tinción del gel con bromuro de etidio 1 mg/mL.

La hibridación de la membrana con el ADN transferido y la sonda marcada con digoxigenina se realizó en un horno de hibridación Hybridiser HB-3D (Techne). La solución de prehibridación se precalentó 10 minutos a 65 °C y a continuación se añadieron 125 µL de ADN de espermatozoos de salmón hervido (10 mg/mL) por cada 25 mL de solución de prehibridación y se dejó atemperando otros 10 minutos a 65 °C. En los tubos de hibridación se añadió la solución de prehibridación precalentada cubriendo toda la membrana y se incubó durante 1 h a 42 °C. En caso de sondas de nueva síntesis, se desnaturalizó a 100 °C 10 minutos con carácter previo a la hibridación, para sondas reutilizadas se omitió este paso. Cuando la sonda era reutilizada se reemplazaba la solución de prehibridación por la de hibridación. Se dejaron hibridando las sondas alrededor de 20 horas a 42 °C en el horno de hibridación. Posteriormente, se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente con SSC 2X + SDS 0.1 % (p/v) a los que siguieron otros dos lavados de 15 minutos cada uno con SSC 0.1X + SDS 0.1 % (p/v) precalentada a 68 °C, usando el horno de hibridación.

La detección de señal se llevó a cabo mediante un anticuerpo anti-digoxigenina- dUTP conjugado con fosfatasa alcalina (Roche). Todos los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. La membrana se equilibró con Tampón 1, incubándola 1 minuto en esta solución. A continuación, se bloqueó durante 1 h en solución de bloqueo 1 %, tiempo tras el cual se añadió el anticuerpo (1 µL por cada 10 mL de solución de bloqueo) y se dejó incubar durante 30 minutos. Después, se lavaron las membranas dos veces en 40 mL de Tween 20 al 0.3 % (v/v) en Tampón 1 durante 15 minutos. Se retiró la solución de lavado y se equilibró 2 minutos en 20 mL de Tampón 3. Para revelar el *Southern* se añadió el sustrato luminiscente de la fosfatasa alcalina, CSPD (Roche) con dilución 1:300, se homogenizó y se incubó 5 minutos en agitación. Finalmente se pusieron las membranas en bolsas de hibridación eliminando cualquier burbuja. Se incubó durante 15 minutos a 37 °C para activar la fosfatasa alcalina. Se expusieron las membranas el tiempo deseado (entre 30 min y 1 h) en el sistema de imagen ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) para poder visualizar el patrón de bandas luminiscentes.

Para los ensayos Dot-blot se procedió de igual forma salvo que se añadieron 5 µL de diluciones seriadas de ADN marcado en paralelo con la sonda sin marcar directamente en la membrana, se dejó secar y se realizó el *crosslink* e hibridación como se ha descrito anteriormente.

Solución de depurinización: HCl 0.25 M.

Solución de desnaturalización: NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M.

Solución de neutralización: Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M, (pH 7.4).



Tampón SSC 20X: NaCl 175 g/L, citrato sódico · 2 H<sub>2</sub>O 88 g/L. Ajustar a pH 7 con HCl 1 M.

Solución de prehibridación: SSC 5X, N-laurilsarcosina 0.1 % (p/v), SDS 0.2 %, solución de bloqueo 1 % (p/v) (Roche), formamida 50 % (v/v), ADN de esperma de salmón 0.05 mg/L. El ADN de esperma de salmón debe de añadirse en el momento de usar la solución, previamente hervido durante 10 min.

Tampón 1: Ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, (pH 7.5).

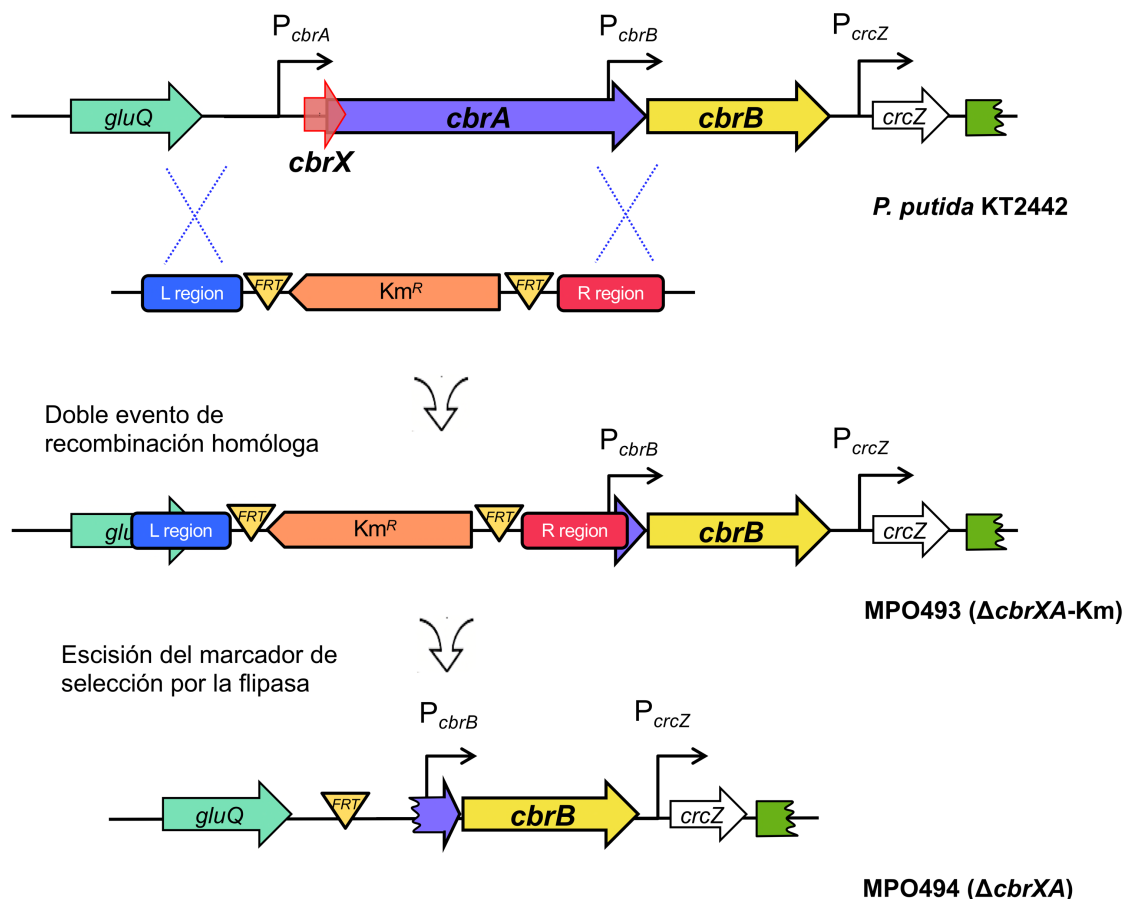
Solución de bloqueo 1 %: 4 mL blocking reagent 10 % en 36 mL de Tampón 1.

Tampón 3: Tris-HCl 100 mM (pH 9.5), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM.

### 3.3. Obtención de estirpes mutantes en *P. putida* KT2442

#### 3.3.1. Construcción de un mutante de delección $\Delta cbrX-cbrA$ , (MPO494)

El mutante MPO494 ( $\Delta cbrX-cbrA$ ), se generó mediante un doble evento de recombinación homóloga del plásmido pMPO485 que contenía las regiones flanqueantes a los genes a deleccionar (*cbrXA*) en *P. putida* KT2442. Para ello, se amplificaron mediante PCR las regiones flanqueantes al gen *cbrA* con las parejas de oligonucleótidos CbrAL1\_fwd/ CbrAL1\_rev (generando los sitios de restricción *EcoRI/BamHI*) para amplificar la región izquierda (L, 650 pb) y CbrAR\_fwd/ CbrAR\_rev (generando los sitios de restricción *BamHI/HindIII*) para la región flanqueante derecha (R, 529 pb), usando siempre ADN genómico como molde. Tras la digestión de estos fragmentos con las enzimas de restricción adecuadas, se clonaron en una ligación a tres en el plásmido pEX18Tc digerido *EcoRI/HindIII* para generar el plásmido pMPO484. De este modo, se elimina la región promotora del gen *cbrA*, incluyendo la totalidad de *cbrX* y una buena parte de *cbrA* (2409 nt de un total de 2976 nt de *cbrA*) pero manteniendo intacto su extremo 3' que contiene el promotor de *cbrB*. El vector resultante se denominó pMPO484. A continuación, se clonó el marcador de resistencia a kanamicina flanqueado por regiones de reconocimiento de la flipasa (FRTs) -escindido con *BamHI* del plásmido pMPO284-, en pMPO484, resultando en el plásmido pMPO485. Este plásmido, no replicativo en *P. putida*, se transfirió por electroporación a la estirpe KT2442 (Choi et al., 2006) y se seleccionaron colonias resistentes al marcador de kanamicina que habían integrado el plásmido mediante un único evento de recombinación homóloga en placas de medio LB-Rif<sup>r20</sup>-Km<sup>25</sup>. Para forzar el doble evento de recombinación y consecuente escisión del fragmento de interés, se dejaron envejecer en LB y se hicieron réplicas en placas de LB-Km<sup>25</sup>-Sac<sup>10</sup> y LB-Rif<sup>r20</sup>-Tc<sup>5</sup>. Los mutantes de delección deben ser resistentes a kanamicina y sensibles a sacarosa y tetraciclina al perder el gen *sacB* y la Tc<sup>R</sup> presentes en el plásmido derivado de pEX18Tc integrado (Figura 20). La estirpe resultante se denominó MPO493.



**Figura 20. Construcción del mutante de delección  $\Delta cbrX$ -*cbrA*.** Diagrama que representa el proceso de recombinación homóloga del plásmido pMPO485 en *P. putida* KT2442 (arriba) mediante el cual se delecionó los genes *cbrX*-*cbrA* incluyendo el promotor de *cbrA* ( $P_{cbrA}$ ) pero conservando el promotor de *cbrB* ( $P_{cbrB}$ ) que se encuentra solapando con el extremo 3' de *cbrA*. En el centro se muestra el cointegrado que da lugar a la estirpe MPO493. Además, se representa el resultado del proceso de escisión del marcador de resistencia a kanamicina ( $Km^R$ ) flanqueado por secuencias FRT (triángulos amarillos) mediada por la enzima flipasa (abajo). La cicatriz que dejan las FRTs incorpora un codón de STOP en la pauta de lectura integrada.

Para eliminar la resistencia a kanamicina de la estirpe MPO493 se transformó mediante conjugación el plásmido pFLP2, que codificaba la flipasa que reconoce las secuencias FRT que la flanqueaban y después de 6-8 h a 30 °C se segregó el parche de conjugación en LB-Cb<sup>500</sup>. Finalmente, se hicieron estrías en placas de Rif<sup>20</sup>-Km<sup>25</sup> y réplicas en Rif<sup>20</sup>-Cb<sup>500</sup>. Los candidatos que crecieron en medio LB pero no en presencia de Km (por haber escindido el gen) ni en Cb (por haber perdido el plásmido pFLP2) fueron seleccionados como clones de interés. La estirpe mutante de delección  $\Delta cbrX$ -*cbrA* se denominó MPO494 (Figura 20).

Finalmente, se extrajo ADN genómico a las estirpes MPO493 y MPO494 y se comprobó su correcta disposición genómica tras la integración del plásmido pMPO485 en el genoma de *P. putida* KT2442, así como la correcta escisión del módulo de kanamicina mediante *Southern blotting* (apartado 3.2.16). Además, a aquellos candidatos que presentaban el patrón correcto, se les extrajo ARN y por PCR cuantitativa con los oligonucleótidos *cbrA1Q* y *cbrA2Q* se comprobó que no expresaba *cbrA*. A la estirpe resultante se le denominó MPO494.

### 3.3.2. Complementación del mutante de delección $\Delta cbrX$ -*cbrA*

La complementación cromosómica del mutante de delección  $\Delta cbrXA$ , MPO494, se basó en el método de integración sitio-específica del transposón miniTn7 en el sitio *glmS* de *P. putida* descrito por (Choi et al., 2005). Los plásmidos con la secuencia silvestre *cbrX-cbrA* así como versiones de *cbrX* con mutaciones puntuales contruidos para tal propósito fueron los siguientes:

- ♦ pMPO1317 (*cbrX-cbrA*): Clonación de la secuencia silvestre *cbrX-cbrA* expresada bajo su propio promotor en pME6182 digerido *HindIII/SmaI* (Valentini et al., 2014). La estirpe resultante se denominó MPO498.
- ♦ pMPO434 (*cbrX*-ATG1): Derivado de pMPO1317 al cual se le ha introducido una mutación puntual en el presumible codón de inicio de *cbrX* que pasa a ser GCA. Se amplificó por PCR un fragmento de 283 pb con los oligonucleótidos CbrAcompIF/ATGpep\_rev y uno de 1757 pb con la pareja de oligonucleótidos ATGpep\_fwd/CbrAEcoRI\_rev. Con ambos fragmentos como molde, se amplificó por PCR solapante con los oligonucleótidos externos CbrAcompIF/ CbrAEcoRI\_rev un inserto de 2 kb (promotor y extremo 5' de *cbrA*) el cual se digirió con las enzimas *HindIII/EcoRI* y se substituyó en pMPO1317 digerido con las mismas restrictasas. La estirpe resultante se denominó MPO497.
- ♦ pMPO1344 (*cbrX*-ATG2): Derivado de pMPO1317 al cual se le ha introducido una mutación puntual en el segundo ATG de *cbrX* que pasa a ser GAT (Met→Asp). Se amplificó por PCR un fragmento de 346 pb con los oligonucleótidos CbrAcompIF/ATG2pep\_rev y uno de 1694 pb con la pareja de oligonucleótidos ATG2pep\_fwd/CbrAEcoRI\_rev. Con ambos fragmentos como molde, se amplificó por PCR solapante con los oligonucleótidos externos CbrAcompIF/ CbrAEcoRI\_rev un inserto de 2 kb (promotor y extremo 5' de *cbrA*) el cual se digirió con las enzimas *HindIII/EcoRI* y se

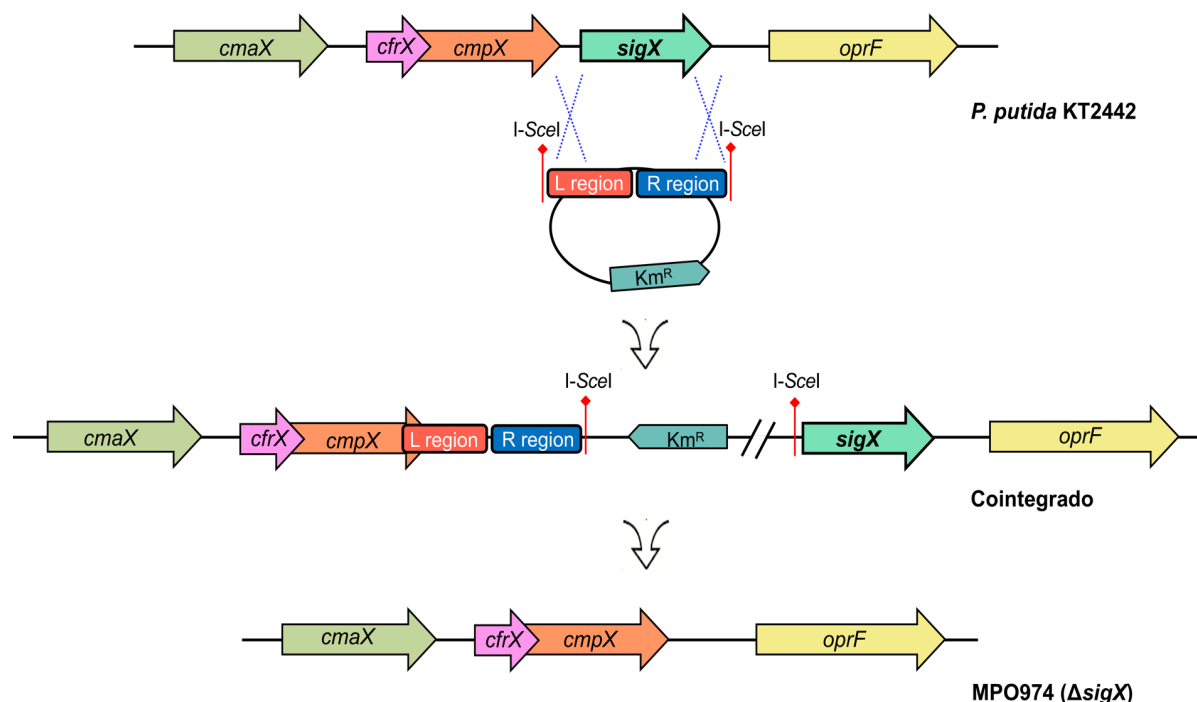
sustituyó en pMPO1317 digerido con las mismas restrictasas. La estirpe resultante se denominó MPO513.

- ♦ pMPO1349 (*cbrX*-ATG1&2): Derivado de pMPO1317 al cual se le ha introducido dos mutaciones puntuales ambos ATGs de *cbrX* que pasan a ser ATG1→GCA (Met→Ala) y ATG2→GAT (Met→Asp). A partir de pMPO434 como molde, se amplificó por PCR un fragmento de 346 pb con los oligonucleótidos CbrAcomplF/ ATG2pep\_rev y uno de 1694 pb con la pareja de oligonucleótidos ATG2pep\_fwd/ CbrAEcoRI\_rev. Con ambos fragmentos como molde, se amplificó por PCR solapante con los oligonucleótidos externos CbrAcomplF/ CbrAEcoRI\_rev un inserto de 2 kb (promotor y extremo 5' de *cbrA*) el cual se digirió con las enzimas *HindIII*/*EcoRI* y se sustituyó en pMPO1317 digerido con las mismas restrictasas. La estirpe resultante se denominó MPO514.
- ♦ pMPO1368 (*cbrX*-ΔT): Derivado de pMPO1317 al cual se le ha delecionado un nucleótido T en la posición +4 de *cbrX* generando un desfase en la pauta abierta de lectura de *cbrX*. Se amplificó por PCR un fragmento de 284 pb con los oligonucleótidos CbrAcomplF/ ATG1-Tpep\_rev y uno de 1754 pb con la pareja de oligonucleótidos ATG1-Tpep\_fwd/ CbrAEcoRI\_rev. Con ambos fragmentos como molde, se amplificó por PCR solapante con los oligonucleótidos externos CbrAcomplF/ CbrAEcoRI\_rev un inserto de 2 kb (promotor y extremo 5' de *cbrA*) el cual se digirió con las enzimas *HindIII*/*EcoRI* y se sustituyó en pMPO1317 digerido con las mismas restrictasas. La estirpe resultante se denominó MPO522.
- ♦ pMPO1369 (*cbrX*-ΔT+C): Derivado de pMPO1317 al cual se le ha delecionado un nucleótido T en la posición +4 e insertado un nucleótido C en la posición +118 de *cbrX* recuperando la pauta abierta de lectura. Se amplificó por PCR un fragmento de 401 pb con los oligonucleótidos CbrAcomplF/ Pep3+C\_rev y uno de 1643 pb con la pareja de oligonucleótidos Pep3+C\_fwd/ CbrAEcoRI\_rev. Con ambos fragmentos como molde, se amplificó por PCR solapante con los oligonucleótidos externos CbrAcomplF/ CbrAEcoRI\_rev un inserto de 2 kb (promotor y extremo 5' de *cbrA*) el cual se digirió con las enzimas *HindIII*/*EcoRI* y se sustituyó en pMPO1317 digerido con las mismas restrictasas. La estirpe resultante se denominó MPO529.

### 3.3.3. Construcción de un mutante de delección $\Delta sigX$ , (MPO973)

La construcción del mutante de delección del gen *sigX* (PP2088) se realizó mediante el sistema de edición de genomas bacterianos basado en la endonucleasa específica I-SceI (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Para ello, se amplificó por PCR las regiones flanqueantes izquierda (L, 681 pb) y derecha (R, 692 pb) al gen *sigX* con las parejas de oligonucleótidos SigXL\_SacFw/ SigXL\_KpnRv y SigXR\_KpnFw/ SigXR\_BamRv, respectivamente. Ambos insertos se clonaron en el vector pBluescript II SK (+) generando pMPO1282 y se comprobaron por secuenciación. A continuación, se subclonaron ambas regiones como un único inserto (1349 pb) en el plásmido no replicativo pEMG digerido previamente con las enzimas *SacI/BamHI*. El plásmido resultante, pMPO1283, se transformó por TSS a la estirpe DH5 $\alpha$   $\lambda$ -*pir* y posteriormente fue transferido a *P. putida* KT2442 mediante conjugación triparental. pMPO1283 es un plásmido no replicativo en *Pseudomonas*, de modo que tras la conjugación se producirá un evento simple de recombinación homóloga a través de una de las dos regiones flanqueantes y los transconjugantes serán resistentes a kanamicina.

Tras comprobar que los cointegrados eran resistentes a rifampicina (Rif<sup>20</sup>) y a kanamicina (Km<sup>25</sup>) como consecuencia a la integración del plásmido pMPO1283 en su genoma, se procedió a conjugar el plásmido pSW-I que porta la endonucleasa específica I-SceI. El parche de conjugación se segregó a colonia aislada en placas de LB con Rif<sup>20</sup> y Cb<sup>500</sup>. Para inducir el segundo evento de recombinación homóloga, es preciso inducir la expresión de I-SceI (expresada bajo el promotor P<sub>m</sub> de XylS) con la adición de 3-metilbenzoato (3MB) de modo que provocará un corte de doble cadena en la hebra del ADN y, por consiguiente, su posterior reparación por la maquinaria celular. Entonces, a partir de inóculos saturados en LB Cb<sup>500</sup>, se diluyeron 100 veces e incubaron a 30 °C hasta alcanzar una A<sub>600</sub>= 0.5, momento en el cual se le adicionó el inductor 3MB a una concentración final de 15 mM. Transcurridas 6-8 h de inducción, se sembraron diluciones seriadas de 10<sup>6</sup> a 10<sup>10</sup> en placas de LB Rif<sup>20</sup> Cb<sup>500</sup> y se incubaron toda la noche a 30 °C. Se hicieron réplicas de las colonias en placas de LB Rif Cb<sup>500</sup> y Rif<sup>20</sup> Km<sup>25</sup> seleccionando aquellos candidatos que fueran resistentes a Cb<sup>500</sup> y sensibles a Km<sup>25</sup> como resultado de la resolución del cointegrado mediante el segundo evento de recombinación homóloga (Figura 21).



**Figura 21. Construcción del mutante de delección  $\Delta sigX$ .** Diagrama que representa el proceso de recombinación homóloga del plásmido pMPO1283 en *P. putida* KT2442 (arriba) mediante el cual se delecionó el gen *sigX*. En el centro se muestra uno de los posibles cointegrados como resultado de recombinación de una de las regiones flanqueantes homólogas a *sigX*. En la parte inferior, se representa la estirpe resultante, MPO974, tras la reparación del corte de doble cadena generado por la endonucleasa I-SceI expresada *in vivo* en el plásmido pSW-I.

Por último, se sembraron las células en placas de LB sin antibiótico y se pusieron cultivos desde colonias aisladas con el fin de que perdieran el plásmido pSW-I. Se hicieron réplicas en  $Rif^{20}$ - $Km^{25}$  y en  $Rif^{20}$ - $Cb^{500}$ . Los candidatos que crecieron en medio LB pero no en presencia de Km (por haber escindido el gen) ni en Cb (por haber perdido el plásmido pSW-I) fueron seleccionados como clones de interés. A continuación, se extrajo ADN genómico a los posibles candidatos y se comprobó mediante PCR su correcta disposición genómica utilizando varias combinaciones de oligonucleótidos internos y externos al gen *sigX* y tras su posterior secuenciación se confirmó que se había producido la delección. La estirpe resultante se denominó MPO973.

### 3.3.4. Construcción de un mutante doble de delección en $\Delta crc$ y $\Delta sigX$ , (MPO974)

La construcción de un doble mutante de delección en los genes *crc* y *sigX*, MPO974, se realizó tal y como se explica en el apartado 3.3.3, empleando la estirpe *P. putida* KT2442-C1 como base para deleccionar *sigX*.

### 3.3.5. Obtención de mutantes supresores de CrcZ mediante mutagénesis por transposición

Los mutantes se generaron mediante mutagénesis por inserción del transposón miniTn5-Km contenido en el plásmido pUTminiTn5-Km. El plásmido pUTminiTn5-Km se transfirió mediante conjugación triparental al mutante  $\Delta crc$  (MPO548) de *P. putida* caracterizado por contener la fusión transcripcional de la región promotora de *crcZ* al gen de resistencia a estreptomicina integrada en su genoma. El parche de conjugación se incubó 8 h a 30 °C y, transcurrido ese tiempo, se resuspendió en 2 mL de tampón fosfato salino 1X. A continuación, se sembraron diluciones seriadas de  $10^5$  a  $10^8$  en medio LB con  $Gm^{10}$  para el conteo de células viables, diluciones de  $10^1$  a  $10^3$  en medio LB con  $Gm^{10}$  y  $Km^{25}$  para seleccionar los mutantes transpuestos totales y, diluciones de  $10^1$  y  $10^2$  en medio LB con  $Gm^{10}$ ,  $Km^{25}$  y concentraciones crecientes de  $Sm^{[25-200]}$  con el fin de seleccionar los mutantes de interés.

Los mutantes de interés se distinguirán por su capacidad de resistir concentraciones de estreptomicina superiores al mutante  $\Delta crc$  (MPO548) lo cual se correlaciona con niveles elevados de CrcZ como consecuencia de la inserción del transposón en un gen determinado. Las colonias resistentes a estreptomicina con inserción del transposón se estiraron en placas con los antibióticos adecuados y se pusieron cultivos en medio líquido para su posterior cribado por dilución en gota detallado en el apartado 3.1.5.1.1.

La frecuencia de transposición se calculó dividiendo el número de transpuestos entre el número de células viables mientras que la frecuencia de aparición de mutantes supresores se estimó dividiendo el número de colonias resistentes a *Sm* entre el número de colonias transpuestas.

### 3.4. Clonaciones en vectores de expresión

#### 3.4.1. Construcción de plásmidos con fusiones transcripcionales a *gfpmut3*

Para monitorizar la expresión génica del sistema Cbr en determinadas condiciones a lo largo del tiempo, tal y como se describe en el apartado 3.5.2., se construyeron fusiones transcripcionales de tres genes dianas de CbrB al gen reportero *gfpmut3::lacZ*. Para ello, las regiones promotoras de *crcZ*, *crcY* y *PP2810* fueron escindidas por restricción con las enzimas *EcoRI/BamHI* de los plásmidos pMPO1316, pMPO1314 y pMPO420, respectivamente. Los fragmentos se clonaron en el vector pMRB1 digerido con *EcoRI/BamHI* para generar los plásmidos pMPO356, pMPO357 y pMPO355 respectivamente.

#### 3.4.2. Construcción de plásmidos con fusiones transcripcionales y traduccionales a *lacZ*

Con el propósito de estimar el efecto de las mutaciones puntuales de *cbrX* sobre la expresión de CbrA, se diseñaron fusiones traduccionales de la región promotora de *cbrA* ( $P_{cbrXA}$ ) al gen reportero *lacZ*. Para ello, se amplificaron mediante PCR la región promotora (coordenadas -421 a +249 desde el ATG) con los oligonucleótidos CbrAcompIF/ PcbrAlongSmaI\_rev usando como ADN molde los plásmidos con la secuencia silvestre pMPO1317 y con diferentes mutaciones puntuales en *cbrX* pMPO434 (ATG1), pMPO1344 (ATG2), pMPO1349 (ATG1&2), pMPO1368 ( $\Delta T$ ) y pMPO1369 ( $\Delta T+C$ ). El producto de PCR resultante (682 pb) se digirió con las enzimas de restricción *HindIII*, haciendo extremo romo con Klenow, y *XmaI* y se clonó de manera dirigida en el vector pMPO200 previamente digerido con *EcoRI*, haciendo romo con la ADN polimerasa del fago T4, y *XmaI*. Los plásmidos resultantes se denominaron pMPO1370, pMPO1371, pMPO1372, pMPO1373, pMPO1374 y pMPO1259, respectivamente.

Para determinar la influencia de Crc sobre la transcripción de *cbrA*, se diseñó una fusión de la región promotora de *cbrA* ( $P_{cbrXA}$ ) al *lacZ* contenida en el plásmido pMPO1357. Se amplificó un fragmento de 465 pb con los oligonucleótidos PcbrAEcoRI\_fwd/ PcbrASmaI\_rev usando como molde ADN genómico de *P. putida* KT2442 y se clonó de manera dirigida en el plásmido pMPO234 dirigido con las enzimas *EcoRI/SmaI*.

En la cuantificación de los niveles de expresión de CrcZ en los distintos mutantes de inserción con miniTn5-Km, se utilizó el plásmido pMPO1284 con la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::lacZ$  equivalente a pMPO1316 donde se sustituyó el marcador de resistencia a



ampicilina por apramicina. En primer lugar, se escindió por restricción el gen *aac(3)/IV* que codifica a la enzima aminoglucósido N(3)-acetiltransferasa obtenido del plásmido pSET152 con *Bfal* y se hicieron extremos romos con la ADN polimerasa del fago T4. A continuación, se clonó en romo el inserto en el plásmido pMPO1316 digerido previamente *SfiI/EcoRI* sustituyendo de este modo el marcador de selección de ampicilina por apramicina.

### 3.4.3. Construcción de plásmidos con versiones de la proteína CbrA

Durante la caracterización de los dominios de la proteína sensora CbrA y su implicación en la recepción de la señal, se diseñaron versiones de la proteína portando una delección en fase de cada uno de sus dominios expresadas bajo el promotor heterólogo  $P_{tac}$ . Además, se les incorporó una *Shine-Dalgarno* sintética optimizada empleando el programa bioinformático *RBS Calculator* (Salis, 2011) para optimizar su tasa de traducción.

- ♦ pMPO358 ( $P_{tac}$ -*cbrA*  $\Delta$ TM): Clonación de *cbrA* expresado bajo el promotor heterólogo  $P_{tac}$ , que conserva el ATG iniciador y el gen al cual se le ha delecionado la secuencia correspondiente a los 13 dominios transmembrana en 3'. La secuencia de inicio de la traducción se encuentra en fase con el resto del gen. Además, se le ha incorporado una *Shine-Dalgarno* optimizada por RBS calculator. Para su construcción se purificó un fragmento de 1714 pb que contenía el casete de expresión *lacI<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>* desde el plásmido pIZ1016 digerido con las enzimas *NcoI*, haciendo extremo romo con Klenow, e *HindIII*. La versión truncada del gen *cbrA* se amplificó por PCR con la pareja de oligonucleótidos CbrAsol1\_fwd/ CbrAsol\_rev usando pMPO483 como molde, y se digirió con las enzimas *HindIII* y *SphI*. Los fragmentos correspondientes al casete de expresión y al gen *cbrA* truncado se clonaron en el vector pME6182 en las dianas *SmaI/SphI*. Con esta clonación se incluye un promotor fuerte junto a una *Shine-Dalgarno* optimizada y después la secuencia de *cbrA* con una delección en fase de los dominios TM (coordenadas +28 y +1575 desde el ATG) con el inicio de traducción. La estirpe resultante se denominó MPO506.
- ♦ pMPO1348 ( $P_{tac}$ -*cbrA*  $\Delta$ PAS): Clonación de *cbrA* expresado bajo el promotor heterólogo  $P_{tac}$ , al cual se le ha delecionado la secuencia correspondiente al dominio PAS en fase con el resto de la secuencia de la proteína. Además, se le ha incorporado una *Shine-Dalgarno* optimizada por RBS calculator. Para su construcción se digirió el plásmido pIZ1016 con las enzimas *NcoI/HindIII*, haciendo ambos extremos romos con Klenow, y se purificó un fragmento de 1714 pb que contenía el casete de expresión

*lacI<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>*. El casete de expresión se clonó en el plásmido pMPO1338 dando lugar al plásmido pMPO1347. Por otra parte, se amplificó por PCR un fragmento de 768 pb con los oligonucleótidos CbrATMSD\_fwd/ CbrATM-NcoI\_rev y se clonó en romo en el sitio de restricción *HindIII* del plásmido pMPO1347, generando pMPO1348. Con esta clonación se incluye un promotor fuerte junto a una *Shine-Dalgarno* optimizada y la secuencia de *cbrA* con una delección en fase del dominio PAS (coordinadas +1881 y +2108 desde el ATG) con el inicio de traducción. La estirpe resultante se denominó MPO515.

Las versiones de la proteína carente de los dominios transmembrana (TM) y del dominio PAS expresadas bajo su propio promotor (pMPO1325 y pMPO1324, respectivamente), fueron cedidas amablemente por Sofía Muñoz (Monteagudo-Cascales et al., 2019).

#### 3.4.4. Construcción de plásmidos con CbrA y CbrA-ΔTM fusionados a GFP

Para determinar la localización intracelular de la proteína CbrA y la versión truncada en sus 13 dominios transmembrana CbrA-ΔTM, mediante microscopía confocal de fluorescencia, se clonaron en el vector de expresión pUC18Sfi-miniTn7BB-Gm las pautas de lectura fusionadas a *gfpmut3* en fase para dar lugar a proteínas de fusión fluorescentes de CbrA-GFP y CbrA-ΔTM-GFP. A continuación, las versiones de CbrA fluorescentes se integraron en el sitio Tn7 del cromosoma.

En primer lugar, se amplificó por PCR el alelo del gen *gfpmut3* que codifica a la proteína fluorescente verde con los oligonucleótidos GFPfusion\_fwd/ PstI\_gfp\_rev, usando como molde el plásmido pMRB1. El fragmento de 767 pb resultante fue digerido con las enzimas de restricción *SpeI*/*PstI* y clonado de manera dirigida en pUC18Sfi-minin7BB-Gm, generando el plásmido pMPO1350. Posteriormente, el casete de expresión *lacI<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>*, procedente de la restricción *NcoI* romo/*HindIII* del plásmido pIZ1016 se clonó en pMPO1350 digerido con las mismas enzimas dando lugar al plásmido pMPO1353.

La construcción de los plásmidos con las versiones de CbrA fusionadas en fase a la GFP se detalla a continuación:

- ♦ pMPO1261 (*P<sub>cbrA</sub>-cbrA'-gfpmut3*): Clonación de *cbrA* en fase con *gfpmut3*, expresada bajo su propio promotor. Se escindió un fragmento de 1.7 kb con las enzimas *HindIII*, romo, y *KspI* y se clonó en el vector pMPO1359 previamente digerido con *SpeI*, romo, y *KspI*. La estirpe resultante se denominó MPO520.

- ♦ pMPO1359 ( $P_{tac}$ -*cbrA*'-'*gfpmut3*): Clonación de *cbrA* en fase con *gfpmut3*, expresada bajo el promotor heterólogo  $P_{tac}$  y portando una *Shine-Dalgarno* optimizada. Para su construcción se amplificó por PCR dos fragmentos de 1623 pb y 1.4 kb con las parejas de oligonucleótidos CbrATMSD\_fwd/ CbrAEcoRI\_rev y CbrAEcoRI\_fwd/ CbrAfusionXhoI\_rev, respectivamente, usando como ADN molde el plásmido pMPO1317. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *HindIII*/*EcoRI* y *EcoRI*/*XhoI*, respectivamente, y ligados en una clonación a tres en pMPO1353 digerido *HindIII*/*XhoI*. La estirpe resultante se denominó MPO519.
- ♦ pMPO1367 ( $P_{cbrA}$ -*cbrA*  $\Delta$ TM'-'*gfpmut3*): Clonación de la versión truncada soluble de *cbrA* en fase con *gfpmut3* y expresada bajo su propio promotor. Un fragmento de 1.6 kb se escindió por restricción con *HindIII* romo/*Sall* desde el plásmido pMPO1325 y se clonó en pMPO1359 digerido *SpeI* romo/*Sall*. La estirpe resultante se denominó MPO521.
- ♦ pMPO1358 ( $P_{tac}$ -*cbrA*  $\Delta$ TM'-'*gfpmut3*): Clonación de la versión truncada soluble de *cbrA* en fase con *gfpmut3*, expresada bajo el promotor heterólogo  $P_{tac}$  y portando una *Shine-Dalgarno* optimizada. Para su construcción se amplificó por PCR un fragmento de 1476 pb con los oligonucleótidos CbrAsol2\_fwd/ CbrAfusionXhoI\_rev a partir del plásmido pMPO1325. A continuación, el inserto correspondiente se digirió con las enzimas *HindIII*/*XhoI* y se clonó en de manera dirigida en pMPO1353. La estirpe resultante se denominó MPO518.

### 3.4.5. Construcción de plásmidos para superproducir CbrA y CbrA- $\Delta$ TM

Para superproducir la proteína nativa CbrA y su versión soluble CbrA- $\Delta$ TM, se clonaron la secuencia codificante de *cbrA* y la secuencia carente de los dominios transmembrana de *cbrA* en el plásmido pTXB1 siguiendo las instrucciones del IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*, New England Biolabs) kit. Ambos plásmidos contenían los genes de las distintas proteínas de interés fusionados en el extremo C-terminal a una mini inteína codificada por el gen *gyrA* de *Mycobacterium xenopi* (Mxe GyrA inteína) con un dominio de unión a quitina (CBD, *Chitin Binding Domain*) permitiendo su purificación sin ningún aminoácido extra por afinidad del precursor de fusión en una columna de quitina (Figura 23).

- ♦ pMPO1279 (CbrA'-inteína-CBD): Clonación de *cbrA* en fase con el tag inteína-CBD en su extremo C-terminal. Se amplificó mediante PCR un fragmento de 3 kb con los

oligonucleótidos CbrA-NdeI\_fwd/ CbrAintein-SpeI\_rev empleando como ADN molde el plásmido pMPO1261. A continuación, se digirió con las enzimas *NdeI/SpeI* y se clonó en el vector pTXB1 previamente digerido con las mismas restrictasas.

- ♦ pMPO1280 (CbrA- $\Delta$ TM'-inteína-CBD): Clonación de *cbrA* soluble en fase con con el tag inteína-CBD en su extremo C-terminal. Para su construcción se amplificó por PCR un fragmento de 1434 pb con los oligonucleótidos CbrATM-NdeI\_fwd/ CbrAintein-SpeI\_rev usando como ADN molde el plásmido pMPO1367. El producto de PCR se digirió con las enzimas *NdeI/SpeI* y se clonó de manera dirigida en el plásmido pTXB1 digerido previamente con las mismas restrictasas.

#### 3.4.6. Construcción de plásmidos con fusión transcripcional de *crcZ* a genes de resistencia a antibióticos

La estimación de los niveles de expresión de CrcZ como método de cribado de mutantes de inserción en la búsqueda de elementos reguladores desconocidos, se realizó a través de la fusión transcripcional de la región promotora de *crcZ* al gen reportero *aadA* que codifica a estreptomicina 3''(9) O-nucleotidil transferasa y confiere resistencia a los antibióticos estreptomicina y espectinomicina. Para la construcción del plásmido pMPO1265 ( $P_{crcZ}::aadA$ ) se escindió por restricción *EcoRI/BamHI* un fragmento de 307 pb correspondiente a  $P_{crcZ}$  desde pMPO1316. Posteriormente, se amplificó mediante PCR un fragmento de 938 pb con los oligonucleótidos *aadA-BamHI\_fwd/ aadA-XhoI\_rev* empleando el plásmido pSEVA421 como ADN molde y se digirió con las enzimas de restricción *BamHI/XhoI*. Finalmente, se realizó una clonación dirigida a tres en el plásmido pMPO1379 digerido previamente con las restrictasas *EcoRI/XhoI*.

### 3.5. Análisis de la expresión génica

#### 3.5.1. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa

Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa para aquellas estirpes que contenían plásmidos con fusiones transcripcionales o traduccionales de secuencias promotoras al gen *lacZ* (plásmidos derivados de pMPO234 o pMPO200, respectivamente), se realizaron según (Miller, 1992). Se partió de preinóculos saturados de 5-10 mL en LB o MM con succinato como fuente de carbono, que se lavaron con tampón fosfato salino 3 veces y se diluyeron en los medios adecuados para el ensayo. Si el medio del ensayo era LB la dilución de inicio del

cultivo fue de  $A_{600} = 0.05$  a partir del preinóculo de LB, y si el medio era MM con succinato u oxalacetato se diluyeron a  $A_{600} = 0.1$  o  $A_{600} = 0.3$ , respectivamente, a partir del preinóculo de MM con succinato. Los cultivos se incubaron a 30 °C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento ( $A_{600} = 0.25-0.5$ ). Una vez alcanzada la  $A_{600}$  adecuada, se tomaron 20-100  $\mu\text{L}$  de cultivo y se mezclaron en hielo con 700  $\mu\text{L}$  de tampón Z con  $\beta$ -mercaptoetanol recién añadido, 30  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 20  $\mu\text{L}$  de SDS 0.1 % (p/v). La mezcla se homogenizó en el vórtex y se mantuvo 5 minutos a 30 °C antes de añadirle 200  $\mu\text{L}$  de ONPG 13 mM (o-nitrofenil galactopiranosido, preparado en tampón Z). Se volvió a homogenizar en el vórtex y se incubó a 30 °C hasta que la mezcla adquirió una tonalidad amarilla, momento en el que se paró la reacción añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 M y poniéndola en hielo. Se anotó el tiempo transcurrido entre la adición de ONPG y la de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se centrifugó la mezcla 15 min a 9300 g y se cuantificó el color amarillo del sobrenadante en un espectrofotómetro a 420 nm. En la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada muestra en unidades Miller se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (Unidades Miller)} = \frac{A_{420}}{V \cdot t \cdot A_{600}} \cdot 1000$$

Actividad: Unidades Miller.

$A_{420}$ : Absorbancia de la reacción a 420 nm de longitud de onda.

V: Volumen de cultivo utilizado en la reacción (mL).

$A_{600}$ : Absorbancia del cultivo a 600 nm de longitud de onda.

t: Tiempo de reacción (minutos).

Tampón Z:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1 mM. Antes de usar, añadir  $\beta$ -mercaptoetanol 0.27 % (v/v).

### 3.5.2. Cuantificación fluorimétrica de la expresión génica

La expresión génica de fusiones transcripcionales al gen *gfpmut3* también se estimó a través de la medida de la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*) para *crcZ*, *crcY* y *PP2810* en los plásmidos pMPO356, pMPO357 y pMPO355, respectivamente. Para ello, las estirpes se cultivaron en LB o MM con succinato durante toda la noche hasta saturación y se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino antes de diluirse en el correspondiente medio a una  $A_{600} = 0.2$  en un volumen final de 150  $\mu\text{L}$ , en placas de 96 pocillos (Costar 96, (Corning)). La placa se incubó a 30 °C con agitación a 510 rpm durante 23 horas en un lector de placas multipocillos Spark 10M Tecan. El aumento de

absorbancia ( $A_{600}$ ) y fluorescencia (excitación a 435 nm y emisión a 535 nm) se monitorizó en intervalos de 15 min durante 24 horas. La fluorescencia se representó como fluorescencia específica siendo ésta la relación de la fluorescencia emitida por la GFP entre la densidad óptica.

### 3.5.3. Retrotranscripción de ARN

La retrotranscripción de ARN total (3-10  $\mu$ g) se llevó a cabo como se describe en (Yuste et al., 2006) con el kit *High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems) que usa como cebadores una mezcla de hexámeros aleatorios. La reacción tuvo lugar en un volumen final de 100  $\mu$ L y se aplicó el programa recomendado por el fabricante (10 minutos a 25 °C y 2 h a 37 °C). El ADN complementario (ADNc) obtenido se limpió con el kit *Quiaquick* (Quiagen) y se eluyó en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Para cuantificar la cantidad de ADNc obtenida, se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 Spectrophotometer el cual calculó la concentración aplicando un coeficiente de extinción de 33 ng cm  $\mu$ L<sup>-1</sup>.

### 3.5.4. RT-PCR semicuantitativa

Se cuantificó la cantidad de ARN mensajero (ARNm) mediante amplificación del ADNc por PCR con un número corto de ciclos (normalmente 25 ciclos). Los ADNc se obtuvieron según (Yuste et al., 2006) con algunas modificaciones. La detección de segmentos de transcritos con un tamaño de amplicón de 177 pb correspondientes al extremo 5' de *cbrA* y *cbrX* se llevó a cabo con las parejas de oligonucleótidos RT-CbrA\_fwd/ RT-CbrA\_rev y RT-cbrX\_fwd/ RT-cbrX\_rev, respectivamente. Además, la cotranscripción de *cbrX* y *cbrA* se analizó mediante RT-PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos RT-PcbrXA\_fwd2/ RT-cbrX\_rev, RT-PcbrXA\_fwd2/ RT-CbrA\_rev y RT-CbrA\_fwd/ RT-CbrA\_rev generando unos amplicones con un tamaño de 207 pb, 414 pb y 177 pb, respectivamente.

En cada reacción de amplificación se usó el kit *Ilustra™ PureTaq™ Ready-to-Go™ PCR beads* (GE Healthcare) empleando como molde 0.5-25 ng de ADNc y siguiendo las instrucciones del proveedor. Para confirmar la integridad del ADNc se amplificó un fragmento de 455 pb del gen ribosómico 16S con los oligonucleótidos *rrn-f27* y *rrn-r519* (Hugenholtz et al., 1998). Se realizaron controles positivos y negativos con ADN genómico de KT2442 y sin molde respectivamente. Los productos de amplificación se resolvieron y visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2 % en tampón TAE 1 X (p/v) con tinción en bromuro de etidio.

### 3.5.5. PCR cuantitativa (RT-qPCR)

En este ensayo, se combina la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR con la cuantificación de ADN a través de la detección de la fluorescencia emitida por el agente intercalante SYBR Green tras unirse específicamente al ADN de doble cadena. De este modo, se diseñaron oligonucleótidos para cada gen a analizar (Tabla 5) con el programa bioinformático Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

En todos los casos, se extrajo ARN de tres réplicas biológicas de cada condición y se retrotranscribió (véase apartados 3.2.14. y 3.5.3.). Una vez obtenido, el ADNc se limpió con el kit *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen) y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Se mezclaron en frío 10 ng de ADNc molde, 300 nM de cada oligonucleótido y 5 µl de *FastGene® IC Green 2x qPCR Universal Mix* (NIPPON Genetics EUROPE) al cual se le añadió el tinte de referencia ROX™ a 50 nM para normalizar las fluctuaciones del indicador fluorescente, en un volumen final de 10 µL por cada reacción para tres réplicas técnicas de reacción de PCR por condición. Los amplicones de PCR variaron entre 80-100 pb. Como curva patrón de calibración se realizaron 5 diluciones seriadas de ADN cromosómico de 25-0.0025 ng del organismo silvestre *P. putida* KT2442, que sirvieron así de referencia para cuantificar la cantidad relativa de ADNc de un gen presente en cada condición. Todas las reacciones se realizaron por triplicado en una placa de 96 pocillos de material óptico (polipropileno). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un termociclador *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante, siguiendo el siguiente programa:

a) Desnaturalización inicial: 2 min a 95 °C.

b) 40 ciclos:

- Etapa de desnaturalización: 10 s a 95 °C.

- Etapa de apareamiento y extensión: 30 s a 60 °C.

c) Subida paulatina de la temperatura desde 55 °C hasta 95 °C (Curva de *melting*). Este último paso es un protocolo de disociación del ADN para detectar posibles productos inespecíficos, como serían los dímeros de oligonucleótidos, a través de las temperaturas de desnaturalización ( $T_m$ ) de los productos presentes en la muestra, calculadas a partir de la curva de disociación obtenida. Si hubiese más de un producto tras la reacción de amplificación aparecería más de una  $T_m$ , en cuyo caso se descartarían los oligonucleótidos usados por falta de especificidad.

Para cada gen se hicieron un mínimo de 3 réplicas biológicas (cultivos diferentes) y de cada réplica biológica un mínimo de 3 réplicas técnicas (3 repeticiones). Los datos obtenidos se normalizaron frente a una de las condiciones de ensayo, que denominamos condición control. Por último, se calcularon las medias y desviaciones estándar de las normalizaciones de todas las repeticiones de cada experimento.

### 3.6. Manipulación de proteínas

#### 3.6.1. Obtención de extractos totales de cultivos bacterianos y separación de fracciones proteicas

Con el objetivo de determinar la localización intracelular de las distintas versiones de la proteína sensora CbrA, se inocularon en MM con succinato a  $A_{600} = 0.1$  las estirpes que expresaban la proteína CbrA silvestre (MPO520) y soluble CbrA- $\Delta$ TM (MPO521) bajo su propio promotor y sobreexpresadas bajo el promotor heterólogo  $P_{tac}$  (MPO519 y MPO518, respectivamente) a partir de cultivos saturados en MM con succinato toda la noche a 30 °C. Cuando fue preciso, se indujo la expresión con IPTG cuando alcanzaron una  $A_{600} = 0.3-0.4$ , momento en el que las células se lavaron tres veces en frío con tampón fosfato salino 1X suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Protease-Inhibitor MixM*, SERVA Electrophoresis), se recogieron por centrifugación durante 20 min a 4000 g y el pellet celular se resuspendió en 1 mL del mismo tampón. A continuación, se procedió a la ruptura celular aplicando 12 pulsos de 2-3 segundos de ultrasonidos en el sonicador digital Branson 450 (Marshall Scientific) con una amplitud del 10 % intercalando 10 s de incubación en hielo entre cada pulso. El lisado celular resultante se centrifugó en frío a 16000 g durante 2 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se anotó como Fracción soluble. Por otra parte, el pellet se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O milliQ, se concentró 10 veces en 100  $\mu$ L de tampón urea, se sometió a 10 pulsos de sonicación y se recogió en otro tubo tras centrifugar a 4 °C a 16000 g durante 2 min, denominándose Fracción de membrana.

Tampón Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub> con inhibidores de proteasas: Relación de 1  $\mu$ L del mix de inhibidores proteasa por 1 mL tampón 1X.

Tampón urea: Urea 8 M y SDS 0.1 % (p/v).

#### 3.6.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas bacterianas tanto de extractos proteicos como proteínas purificadas se determinó mediante la cuantificación por Bradford (Bradford, 1976) utilizando



el sistema comercial BioRad *Protein Assay kit*. No obstante, para la cuantificación de muestras solubilizadas con tampón urea como las fracciones de membrana, se empleó el kit *RC DC Protein Assay* (Bio-Rad) basado en el método tradicional de Lowry (Lowry et al., 1951), siguiendo las instrucciones del proveedor. Este nuevo método permite cuantificar proteínas en presencia de agentes reductores o detergentes en elevadas concentraciones que interfieren con los métodos tradicionales de Lowry, Bradford o BCA. En todos los casos se utilizó como patrón la seroalbúmina bovina (BSA).

### 3.6.3. Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Para analizar la cantidad de proteína total de la célula se recogió el pellet correspondiente a 1 mL de cultivo y se resuspendió en 25  $\mu$ L de agua por cada unidad de  $A_{600}$  del cultivo. A continuación, se le añadió 1 volumen de tampón de carga 2X, se hirvió entre 5-10 minutos y se centrifugó para eliminar los restos celulares, utilizando normalmente 5-10  $\mu$ L del sobrenadante para visualizar las proteínas en gel. Cuando se analizaron extractos de proteína soluble se les añadió 1 volumen de tampón de carga 2X antes de cargarlos en el gel, mientras que para visualizar la fracción precipitada (insoluble) de proteínas resultante de la preparación de los extractos, se procedió de la misma forma que en el análisis de la proteína total salvo hirviendo al menos 15 minutos antes de cargar la muestra.

En aquellos casos en los que se realizó una cuantificación previa de las proteínas presentes en cada extracto celular, se mezclaron de 10-30  $\mu$ g de proteína total con tampón de carga 2X en un volumen final de 10-15  $\mu$ L, aproximadamente. Las mezclas se hirvieron entre 5-10 minutos, se centrifugaron al menos 2 min a 16000 *g* para eliminar posibles restos celulares y se cargaron en el correspondiente gel de poliacrilamida-SDS.

Las proteínas fueron analizadas en base a su peso molecular mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS 0.1 % (p/v), según el método descrito por (Laemmli, 1970). La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida-SDS discontinuos, consistentes en una parte superior de empaquetamiento (gel *stacking*) y una parte inferior de separación (gel *running*). Habitualmente, se usaron geles de separación al 7.5 y 10 % de acrilamida, según el tamaño de las proteínas a separar, con un gel de empaquetamiento al 4.5 %. Como marcador de peso molecular se usó el marcador B de *Ready Gel Bands* (Bio-Rad) o bien, los marcadores preteñidos *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (Thermo-Scientific) o *Precision Plus Protein™ All Blue* (Bio-Rad) dependiendo de la finalidad del gel. La electroforesis se realizó en Tank Buffer 1X a una intensidad de

corriente fija de 30 mA por gel en el equipo Mini Protean® Tetra-cell (Bio-Rad). Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con agua del gel y se tiñó con *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se lavó con agua y se secó en un secador de geles Hoefer™ Slab Gel Dryer CD 2000 (GE Healthcare) durante 1 hora a 80 °C para su conservación.

Tampón de carga 2X: Tris-HCl 160 mM (pH 8), glicerol 20 % (v/v), SDS 4 %, azul de bromofenol 0.1 % y β-mercaptoetanol 10 % (v/v).

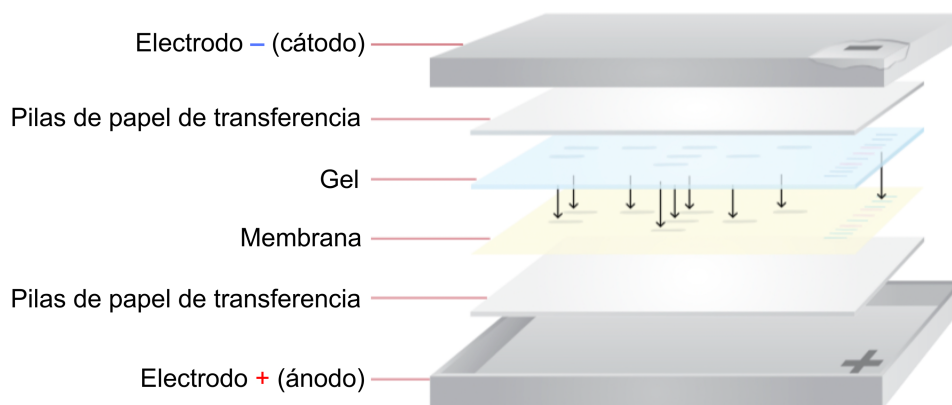
Gel *stacking* o de empaquetamiento: Tris-HCl 125 mM (pH 6.8), SDS 0.1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida al 4.5 %, persulfato amónico (APS) 0.1 % y TEMED 0.1 % (v/v).

Gel *running* o de separación: Tris-HCl 375 mM (pH 8.8), SDS 0.075 %, acrilamida:bisacrilamida 40 % (37.5:1) al 7.5-10 %, persulfato amónico (APS) 0.033 % y TEMED 0.067 %.

Tank Buffer 1X: Trizma base 25 mM, glicina 19.2 mM y SDS 0.1 % (p/v).

#### **3.6.4. Detección de proteínas separadas en PAGE por reconocimiento antígeno-anticuerpo (*Western blotting*)**

En primer lugar, se realizó una electroforesis convencional en gel de poliacrilamida-SDS al 10 % preparado según el kit *TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide* (Bio-Rad) cargando 10 µg de proteína total de cada extracto (fracción soluble y fracción de membrana). Antes de proceder a la transferencia de las proteínas separadas en función de su peso molecular, se activó el gel con luz UV permitiendo visualizar con gran sensibilidad las proteínas gracias a compuestos trihalo que emiten fluorescencia al reaccionar con residuos de triptófano (Posch et al., 2013). Tras comprobar la carga homogénea de las muestras, se equilibró la membrana de nitrocelulosa junto a dos pilas de 7 capas papel de transferencia en tampón de transferencia 1X durante 2 min. La transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana se realizó usando el sistema de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System RTA Transfer kits* (Bio-Rad) (Figura 22) fijando una diferencia de potencial límite de 25 V y una intensidad de corriente constante de 1.3 A durante 20 minutos para favorecer la transferencia de las proteínas de mayor peso molecular.



**Figura 22. Esquema de la transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ Transfer System RTA Transfer (Bio-Rad).** Se representa el orden de ensamblaje del sándwich de transferencia. La membrana de nitrocelulosa se colocó sobre una pila de papel de filtro y sobre éste se colocó el gel con las proteínas junto a otra pila de papel de filtro impregnados previamente en tampón de transferencia. El sándwich resultante se colocó sobre el ánodo (+) y el conjunto se cerró con la superficie que actuará como cátodo (-).

Una vez terminada la transferencia, la membrana se incubó durante 1 h en solución de bloqueo al 5 %, se lavó 4 veces durante 15 minutos cada vez con TTBS 1X y se incubó con el anticuerpo primario policlonal (anti-GFP IgG, Sigma-Aldrich) diluido 2000 veces en solución de bloqueo al 5 % toda la noche a 4 °C con agitación. A la mañana siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se volvió a lavar la membrana 4 veces con tampón TTBS 1X para retirar el anticuerpo en exceso. Luego se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP-IgG, Sigma-Aldrich) diluido 10000 veces en solución de bloqueo al 5 %. Finalmente, se repitieron los lavados con TTBS 1X (4 lavados de 15 minutos) y para detectar el anticuerpo se usó el kit de revelación *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) mezclando 200 µL de cada solución y dejando actuar durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se secó el exceso de reactivo de la membrana y ésta se expuso en el sistema de imagen ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) durante el tiempo necesario (entre 5 y 15 minutos).

Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8.3), 20 % etanol.

TBS 10X: Tris-HCl 1 M (pH 7.5), NaCl 2.5 M.

TTBS 1X: Tween-20 al 0.05 % (v/v) en TBS 1X.

Solución de bloqueo al 5 %: leche en polvo desnatada 50 g/L en TTBS 1X.

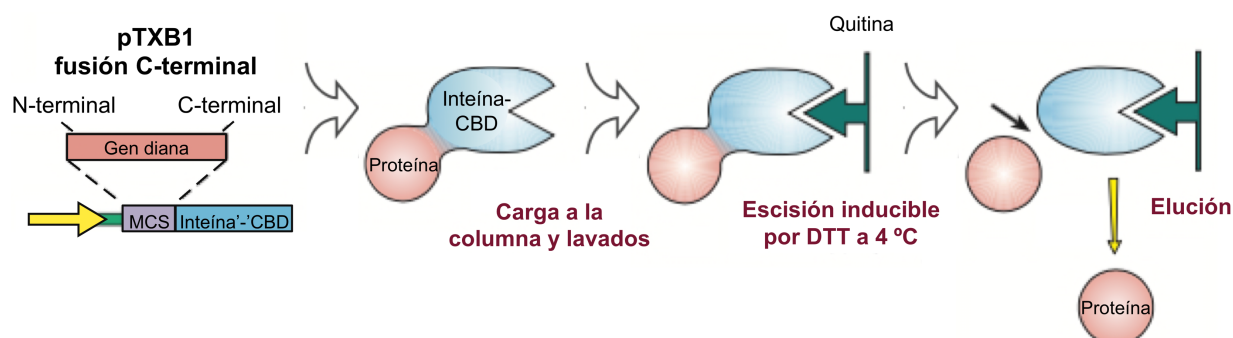
### 3.6.5. Superproducción de proteínas en *Escherichia coli*

Para purificar las proteínas CbrA silvestre y su versión CbrA- $\Delta$ TM carente de los 13 dominios transmembrana (CbrA- $\Delta$ TM) en *E. coli*, se superprodujeron en los plásmidos pMPO1279 y pMPO1280 (véase apartado 3.4.5.) en las estirpes BL21 (DE3) pLysS y ER2566 según las instrucciones del IMPACT™ kit. Como control negativo se usó el vector original donde se había clonado (pTXB1).

En el proceso de superproducción de las proteínas recombinantes CbrA y CbrA- $\Delta$ TM fusionadas a la inteína en su extremo C-terminal se siguió el siguiente protocolo: A partir de inóculos saturados en LB con ampicilina de las estirpes *E. coli* ER2566 y *E. coli* BL21 DE3 pLysS transformadas con los plásmidos pMPO1279 y pMPO1280, se diluyeron 100 veces en 0.5 L de medio fresco y se incubaron a 37 °C en agitación hasta que la  $A_{600}$  alcanzó un valor cercano a 0.4. A continuación se adicionó el inductor IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se incubaron toda la noche a 16 °C. Al día siguiente, las células se recogieron por centrifugación a 4 °C durante 20 min a 4000 g, se lavó con 25 mL de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8.1) y tras centrifugar de nuevo, los sedimentos se congelaron a -80 °C.

### 3.6.6. Purificación de la proteína truncada CbrA- $\Delta$ TM

Para proceder a la purificación de la proteína CbrA- $\Delta$ TM se usó una cromatografía de afinidad basada en la interacción del dominio de unión de quitina de nuestra proteína recombinante a una columna cargada con una resina de quitina (S6651S, New England) en base a las instrucciones del fabricante (Figura 23).



**Figura 23. Esquema del proceso de purificación de proteínas fusionadas en su extremo C-terminal según IMPACT™ kit.** El casete de expresión contenido en el plásmido pTXB1 permite la superproducción de proteínas fusionadas en su extremo C-terminal al tag inteína y en él se representa el promotor de T7 en amarillo, la secuencia codificante del gen de la proteína de interés en rosa, el sitio de clonación múltiple en morado y la secuencia del tag inteína en azul. Tras la superproducción de la

proteína de interés fusionada a la inteína, se cargará en la columna de afinidad de quitina y se inducirá la escisión del tag empleando reactivos como el DTT que liberarán a la proteína. Finalmente, se eluirá la proteína de interés a través de diferentes lavados de la columna con tampón de diálisis.

Todos los siguientes pasos se realizaron a 4 °C. Los sedimentos de 0.5 L de cultivo inducido de la estirpe ER2566 conteniendo el plásmido pMPO1280 se resuspendieron en 15 mL de tampón de unión. La lisis bacteriana se realizó mediante sonicación aplicando 20 pulsos de 10 s al 30 % de amplitud intercalando 10 s de incubación en hielo entre cada pulso. Tras el proceso de ruptura celular, se centrifugó la muestra 20 min a 12000 g y la muestra se filtró con filtros de 0.22 µm. A continuación, el sobrenadante filtrado se cargó a la columna de quitina previamente equilibrada con 50 mL de tampón de unión a un flujo de 0.4 mL/min. La columna fue lavada con 100 mL de tampón de unión y, a continuación, se procedió a eluir la proteína de interés aplicando 20 mL de tampón de unión con 50 mM de DTT y dejando incubar toda la noche a 4 °C. Después de la incubación, se eluyeron 12 mL de proteína que se sometió a diálisis toda la noche a 4 °C empleando 1 L de tampón de diálisis.

Se recogieron todas las fracciones y se detectó la presencia de CbrA-Δ<sup>TM</sup> mediante visualización en un gel de poliacrilamida-SDS según se detalla en el apartado 3.6.3. Las fracciones de interés se concentraron mediante el uso de Centricones de 10K (Amicon Ultra, Millipore) en un volumen final de 3 mL y se conservaron a -80 °C. La concentración de proteína se calculó usando un método basado en el descrito por Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) y la pureza se estimó visualmente mediante SDS-PAGE en paralelo con seroalbúmina bovina como control de carga.

Tampón de unión: Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 500 mM.

Tampón de diálisis: Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 150 mM.

### **3.7. Técnicas de microscopía y análisis de imágenes**

#### **3.7.1. Microscopía confocal de superresolución**

Todas las observaciones microscópicas de cultivo se realizaron en un microscopio confocal de barrido láser Zeiss 880 (CLSM) (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) equipado con un láser de argón, un detector Airyscan y un conjunto de filtros para el seguimiento de la expresión de proteínas fluorescentes verde (GFP) (excitación 488 nm, emisión 517 nm), cian (CFP), roja (RFP) y amarilla (YFP). Con el fin de maximizar la resolución, las imágenes fueron obtenidas utilizando un objetivo de inmersión en aceite 63X/1.48 NA y un láser de argón a 488

nm como fuente de excitación de la proteína fluorescente verde. Las proyecciones de máxima intensidad obtenidas de pilas de un total de 5 secciones en el plano Z (*z-stacks*) se analizaron con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012). El preprocesamiento de las imágenes comprendió ajustes lineales como brillo y contraste seguido de un filtro de normalización gaussiano con radio 1.5 y finalmente, un algoritmo de nitidez.

Para detectar la localización celular de la proteína CbrA silvestre y CbrA- $\Delta$ TM soluble fusionadas a GFP, se establecieron cultivos de las estirpes MPO519, MPO518, MPO520 y MPO521 en MM con succinato y se dejaron inducir durante 3 h hasta alcanzar la fase exponencial media ( $A_{600}=0.3$ ). La preparación de las muestras bacterianas consistió en incubar 0.5 mL de cada cultivo en placas de cultivo con fondo de vidrio de 35 mm (MatTek) durante 15 min a temperatura ambiente, realizar cuidadosamente dos lavados con tampón fosfato salino 1X y, por último, fijar las muestras con *p*-formaldehído (PFA) al 4 % durante 10 min.

### 3.8. Medida de la estabilidad térmica por las interacciones proteína-ligando

La medida de estabilidad térmica de la interacción de la proteína CbrA- $\Delta$ TM con diversos ligandos se llevó a cabo mediante estudios de fluorescencia como fluorimetría diferencial de barrido.

#### 3.8.1. Fluorimetría diferencial de barrido

Los ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (del inglés *Differential Scanning Fluorimetry*) se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo cónico (Costar 96, Corning) y se definieron dos etapas: una etapa de normalización y una etapa de titulación. En la etapa de normalización se pretendió determinar las condiciones de tampón y sales más favorables para la estabilidad de la proteína. Para ello, se mezcló en un volumen final de 20  $\mu$ L, la proteína a 10  $\mu$ M y una dilución del fluoróforo SYPRO Orange 5X con distintos tampones como Tris-HCl, HEPES-NaOH y MES-NaOH a pH 6, 7.5 y 8.1 y acetato sódico con ácido acético (NaAc-HAc) a pH 4 y 5, a una concentración final de 20 mM y 100 mM. Además, se les adicionó NaCl en un rango de concentraciones de 0 mM a 150 mM. Una vez definidas las condiciones óptimas para la proteína, se procedió a la titulación con concentraciones de ligando comprendidas entre 0.34 mM y 7.5 mM. Como controles se pusieron 20  $\mu$ L del medio tamponado sin proteína (*No Protein Control*, NPC) y medio tamponado con ligando (*Ligand Only Control*, LOP).

Las medidas se registraron en el sistema *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) programado para que la temperatura aumentara gradualmente a razón de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  desde los  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta los  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los cambios en la intensidad de la fluorescencia del SYPRO Orange se midieron excitando las muestras a  $492\text{ nm}$  y observando la emisión de fluorescencia a  $575\text{ nm}$ . Los valores de  $T_m$  se calcularon a partir del primer mínimo negativo en la derivada de las trazas de fluorescencia registradas, usando el programa *CFX Manager™ Software* (Bio-Rad).

### 3.9. Otros ensayos

#### 3.9.1. Cuantificación de nucleótidos de piridina

La inducción de los cultivos a partir de los cuales se realizó la extracción y cuantificación de los nucleótidos de piridina  $\text{NAD}^+(\text{H})$ ,  $\text{NADP}^+(\text{H})$  y de los nucleótidos ATP/ADP siguió el procedimiento aplicado en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa. En cada extracción se partió de biomasa correspondiente a  $400\text{ mL}$  de cultivo a  $A_{600} = 0.3$  en medio LB obtenida a partir de un preinóculo de  $20\text{ mL}$  crecido o/n en el mismo medio. Alcanzada la densidad óptica adecuada, se recogieron las células por centrifugación en frío a  $13000\text{ rpm}$   $2\text{ min}$ . Se retiró el sobrenadante guardando previamente  $1\text{ mL}$  que se utilizará para hacer blanco y descartar posibles interferentes del medio LB. El pellet se transpasó a un tubo eppendorf de  $1.5\text{ mL}$ , se centrifugó de nuevo y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas se guardaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesadas.

Finalmente, el procesamiento de las muestras, la extracción y cuantificación de los distintos nucleótidos se realizó en el laboratorio de fisiopatología celular y bioenergética de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla). Las concentraciones se normalizaron en función de los  $\text{mg}$  de proteínas del extracto total y los coeficientes *redox* se calcularon como  $[\text{NADH}/\text{NAD}^+]$  y  $[\text{NADPH}/\text{NADP}^+]$ .





## RESULTADOS



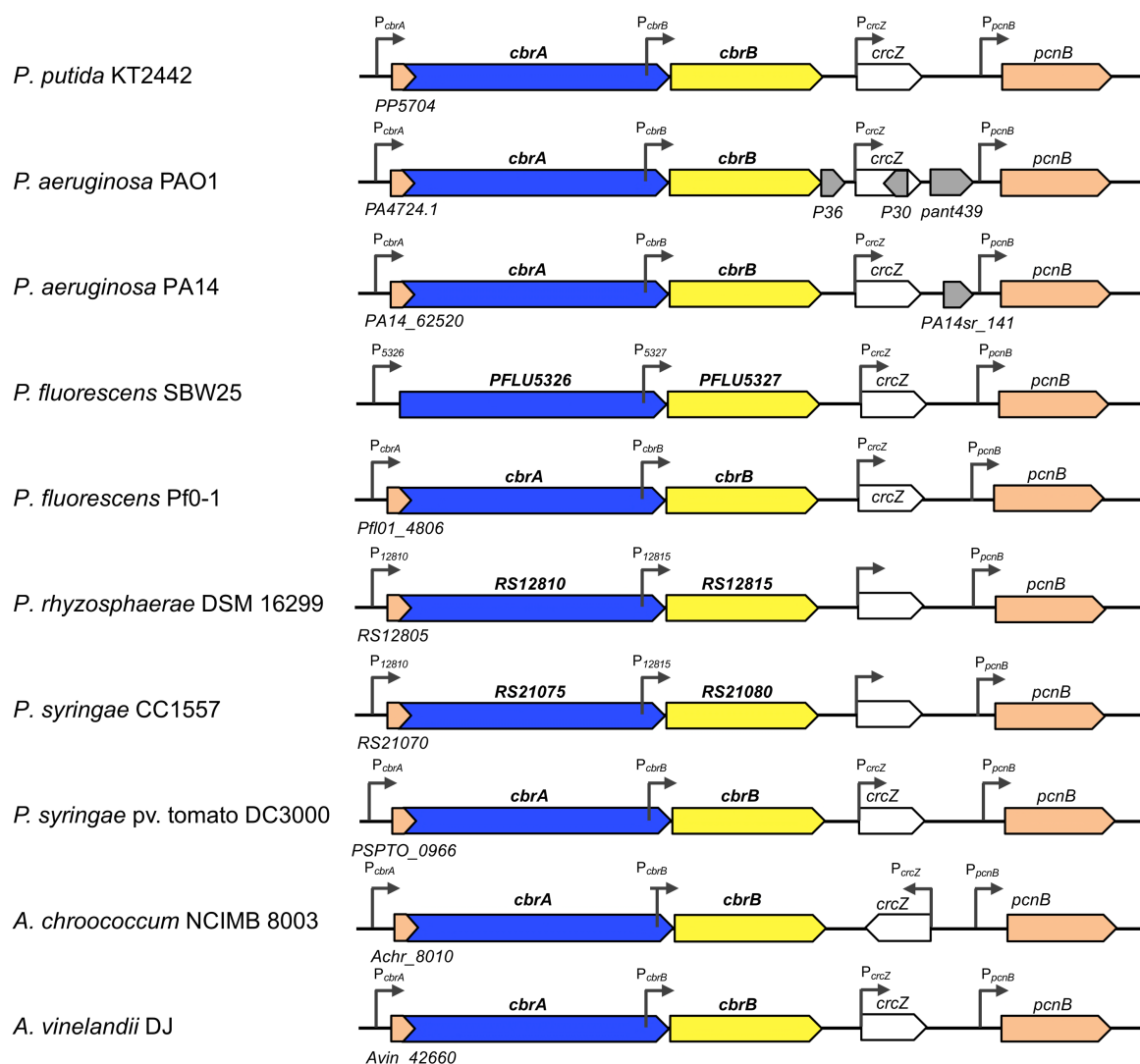
## Capítulo 1. Regulación de la expresión de *cbrAB*

### 4.1.1. Localización genómica de *cbrA-cbrB*

En el contexto genómico de *P. putida*, los genes *cbrA* y *cbrB*, que codifican la histidina quinasa y el elemento regulador de respuesta del sistema de dos componentes CbrAB, se encuentran agrupados en una misma unidad transcripcional según el software de predicción de operones DOOR (*Database for prokaryotic Operons*) (Mao et al., 2009) empleado por la base de datos de *pseudomonas.com* (Figura 24). Aguas arriba de la región codificante de *cbrA* se localiza el promotor  $P_{cbrA}$  que controla la expresión de *cbrAB*. Además, en nuestro grupo se ha identificado un promotor interno en el extremo 3' de *cbrA* que dirige la expresión de *cbrB* y se ha denominado  $P_{cbrB}$  (Amador et al., 2016), que coincide con el identificado previamente en *P. aeruginosa* (Nishijyo et al., 2001). *cbrB* se expresa mayoritariamente desde  $P_{cbrB}$ , aunque existe una pequeña expresión basal que consideramos no significativa, desde  $P_{cbrA}$  (datos no mostrados).

En el genoma de *P. putida* y aguas abajo de *cbrB* en una unidad transcripcional independiente, se encuentra el gen *crcZ* que codifica a un ARN regulador. CrcZ junto a otros ARNs similares (CrcY en *P. putida* KT2440 y CrcX en *P. syringae* DC3000), ejercen un efecto antagonista al proceso de represión catabólica mediado por el complejo Hfq/Crc en las bacterias de la familia de las *Pseudomonas* (véase introducción, apartado 1.4.1). En *P. putida* los promotores  $P_{crcZ}$  y  $P_{crcY}$ , dependientes del factor alternativo  $\sigma^N$ , son directamente activados por CbrB con una transcripción *read-through* que permite mantener unos niveles basales elevados y controlar la disponibilidad de Hfq/Crc en condiciones CCR (véase introducción, apartado 1.3.3) (García-Mauriño et al., 2013; Hernández-Arranz et al., 2016).

La organización genómica de *cbrA*, *cbrB* y *crcZ* se encuentra altamente conservada en distintas especies los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* de la familia *Pseudomonadaceae*, únicos géneros donde se ha descrito (Figura 24). La conservación de la sintenia convierte al sistema Cbr en un sistema de dos componentes exclusivo de las *Pseudomonadaceae* lo cual ha suscitado un gran interés por desentrañar los mecanismos de regulación, detección y transducción de la señal activadora por parte de la histidina quinasa CbrA.



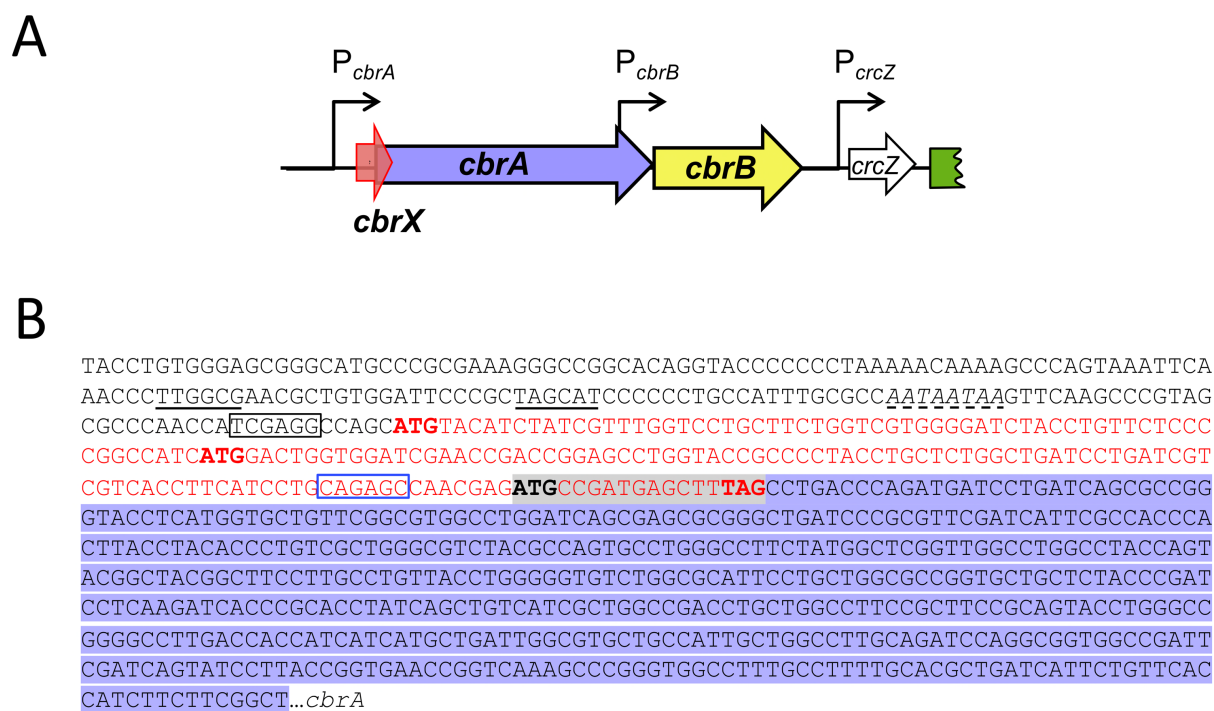
**Figura 24. Organización genómica del locus *cbrA-cbrB-crcZ* en la familia *Pseudomonadaceae*.**

Representación gráfica de la organización génica de *cbrA* (azul), *cbrB* (amarillo) y *crcZ* (blanco) en *P. putida* KT2442, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PA14, *P. fluorescens* SBW25, *P. fluorescens* Pf0-1, *P. rhizosphaerae* DSM 16299, *P. syringae* CC1557, *P. syringae* pv. tomato DC3000, *A. chroococcum* NCIMB 8003 y *A. vinelandii* DJ. Las regiones promotoras se simbolizan mediante flechas, en gris otros posibles ARNp y en naranja genes adyacentes.

#### 4.1.2. Identificación de la pauta abierta de lectura *cbrX*

El análisis detallado de la región promotora de *cbrA* reveló la presencia de una pauta abierta de lectura inicialmente no anotada en la base de datos de Pseudomonas.com denominada PP5704, que se halla solapando parcialmente con el inicio de traducción de *cbrA* (Figura 25). En este trabajo hemos denominado a esta pauta abierta de lectura no anotada *cbrX*.

La secuencia de *cbrX* codifica un pequeño péptido de tan sólo 58 aminoácidos de función actualmente desconocida. Dado que *cbrX* solapa con la secuencia de *cbrA* en 17 nt debe pertenecer a un mismo ARNm y, por lo tanto, transcribirse a partir del mismo promotor. *cbrX* y *cbrA* se traducen en pautas abierta de lectura diferentes. Además, el ARNm contiene una posible *Shine-Dalgarno* de secuencia semiconservada (TCGAGG) localizada a 5 pb aguas arriba del primer ATG, posible inicio de la traducción de *cbrX*, que podría constituir el sitio de unión de ribosomas de *cbrX* (Figura 25 B).



**Figura 25. Organización genómica del locus *cbrX-cbrA-cbrB* en *Pseudomonas putida*. (A)** Representación gráfica de la organización génica de *cbrX* (PP5704, en rojo), *cbrA* (PP4695, en morado), *cbrB* (PP4696, en amarillo) y *crcZ* (PPmr53, en blanco) en *Pseudomonas putida* KT2442. Las regiones promotoras de *cbrA*, *cbrB* y *crcZ* se simbolizan mediante flechas. **(B)** Secuencia de ADN de la región promotora de *cbrX* y de *cbrA* en *Pseudomonas putida* KT2440. Las secuencias subrayadas corresponden a las cajas conservadas -10 y -35, el sitio de unión de Crc predicho se indica en cursiva y subrayado con línea discontinua, las posibles *Shine-Dalgarno* de *cbrX* “TCGAGG” y de *cbrA* “CAGAGC” se representan recuadradas en negro y en azul, respectivamente. La secuencia codificante de *cbrX* se representa en rojo, la secuencia de *cbrA* sombreada en morado y la región solapante entre *cbrX* y *cbrA* se halla sombreada en gris. Los codones de inicio y de stop se resaltan en negrita.

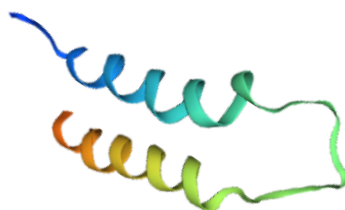
La búsqueda en las bases de datos de ortólogos a *cbrX* reveló que esta secuencia es exclusiva de la familia *Pseudomonadaceae* y que además está altamente conservada dentro de los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Azotobacter*. La identidad obtenida tras la realización de un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas (Blastp) alcanzó el 100 % en *P. putida* DOT-TE1 y *P. rhizosphaerae* DSM, un 97 % con *P. aeruginosa* PAO1 mientras que un 95 % de identidad con *P. fluorescens* Pf0-1, *P. mendocina* DLHK, *P. syringae* CC1557, *A. beijerinckii*, *A. chroococcum* NCIMB 8003 y *A. vinelandii* DJ (Figura 26 A). Además, no se ha detectado la presencia de parálogos en *P. putida*.

La predicción de estructura secundaria mediante la herramienta SOSUI ([http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)) y su modelado por homología con otras proteínas desarrollado por SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) reveló la presencia de dos  $\alpha$ -hélices que podrían hallarse insertas en la membrana interna de la célula, próximas a los dominios transmembrana de CbrA (Figura 26 B). Los dos motivos estructurales identificados y predichos como  $\alpha$ -hélices corresponden a las secuencias LVVGIYLFSPAIM y YLLWLILIVVTFIL indicadas en la figura 26 A.

A

Pseudomonas putida KT2442	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Pseudomonas putida DOT-TE1	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Pseudomonas aeruginosa PAO1	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDPNGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Pseudomonas fluorescens Pf0-1	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDATGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Pseudomonas mendocina DLHK	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDPNGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Pseudomonas rhizosphaerae DSM	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Pseudomonas syringae CC1557	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDATGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Azotobacter beijerinckii	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDPDGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Azotobacter chroococcum NCIMB 8003	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDPNGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58
Azotobacter vinelandii DJ	MYIYRLVLLLVVGIYLFSPAIMDWWIDPNGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL	58

B

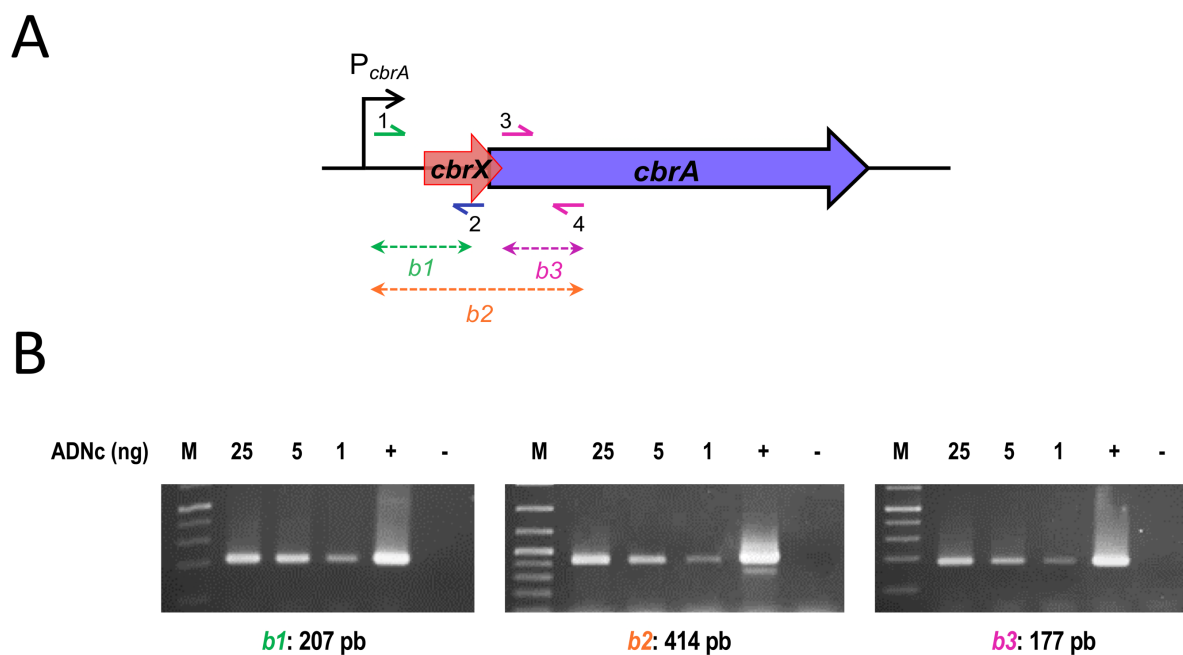


**Figura 26. Conservación de la secuencia de CbrX y predicción de estructura secundaria. (A)** Alineamiento de la secuencia de CbrX en diferentes estirpes de la familia *Pseudomonadaceae*. Los aminoácidos idénticos se indican en azul, los aminoácidos de características físico-químicas similares en verde y los aminoácidos no conservados en rojo. En la parte superior de la secuencia se indican las secuencias correspondientes a las  $\alpha$ -hélices representadas en el panel B. **(B)** Estructura secundaria de CbrX predicha mediante el modelado por homología de estructuras proteicas por SWISS-MODEL (ExPASy).

La comparación de la secuencia de CbrX en las bases de datos mostró un elevado grado de similitud con proteínas de transporte tipo MSF (*Major Facilitator Superfamily*) destinadas principalmente a la captación de nutrientes o la expulsión de compuestos nocivos a través de la membrana. Así, el elevado grado de conservación de *cbrX* dentro de la familia *Pseudomonadaceae* y su analogía estructural con proteínas de transporte tipo MSF sugieren que CbrX podría participar en el proceso de recepción/transducción de la señal activadora del sistema o bien, ejercer un mecanismo de regulación sobre la expresión de *cbrA*. En este capítulo se estudia el papel regulador de *cbrX* sobre la expresión de *cbrA*.

#### 4.1.2.1. Regulación de la expresión de *cbrX-cbrA*

El inicio exacto de la transcripción del ARNm que comprende *cbrX* y *cbrA* no ha podido ser identificado hasta la fecha, probablemente debido a sus bajos niveles de expresión (datos no mostrados). Para descartar la presencia de un posible promotor interno entre ambos genes que diferenciase la expresión de *cbrA* de la de *cbrX* generando otro ARN mensajero diferente, se cuantificaron los niveles de expresión del ARNm mediante RT-PCR semicuantitativa en *P. putida* KT2442 silvestre en condiciones de inducción (medio mínimo con oxalacetato como fuente de carbono). Se monitorizó la amplificación de tres segmentos del ARNm localizados entre la región 5'UTR no traducida y la región codificante de *cbrX* (*b1*), entre la región 5'UTR y la región codificante de *cbrA* (*b2*), y dentro de la región codificante de *cbrA* (*b3*) (Figura 27).



**Figura 27. Estudio de la cotranscripción de *cbrX* y *cbrA*.** (A) Diagrama que representa el contexto genómico de *cbrX* y *cbrA*, los oligonucleótidos y amplicones empleados en la RT-PCR. El amplicón *b1* (207 pb; verde) se obtuvo con los oligonucleótidos 1 (RT-PcbrXA\_fwd2) y 2 (RT-cbrX\_rev), el amplicón *b2* (414 pb; naranja) con los oligonucleótidos 1 y 4 (RT-CbrA\_rev), y el amplicón *b3* (177 pb; rosa) con los oligonucleótidos 3 (RT-CbrA\_fwd) y 4 (RT-CbrA\_rev) (B) Amplificación de ADN en la RT-PCR a partir de ADNc de un cultivo de *P. putida* KT2442 cultivado en medio mínimo con oxalacetato. Los amplicones *b1*, *b2* y *b3* se muestran consecutivamente en los paneles de izquierda a derecha. La cantidad de ADNc en nanogramos usada como molde para la PCR se indica en la parte superior de los paneles (entre 25 y 1 ng). M corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder (ThermoFisher Scientific). Los controles positivos (+) se realizaron con ADN genómico mientras que los controles negativos (-) sin ADN para cada pareja de oligonucleótidos.

El análisis de la cantidad de ARNm obtenido tras la retrotranscripción para las tres combinaciones de oligonucleótidos mostró fragmentos del tamaño esperado. Además, no se apreciaron diferencias significativas en la cantidad de ARNm entre ellos (Figura 27 B) por lo que se descartó la presencia de algún promotor interno que dirigiese la expresión de *cbrA* de forma independiente de *cbrX*, y quedó demostrado que *cbrX* y *cbrA* se cotranscriben en una misma unidad transcripcional.

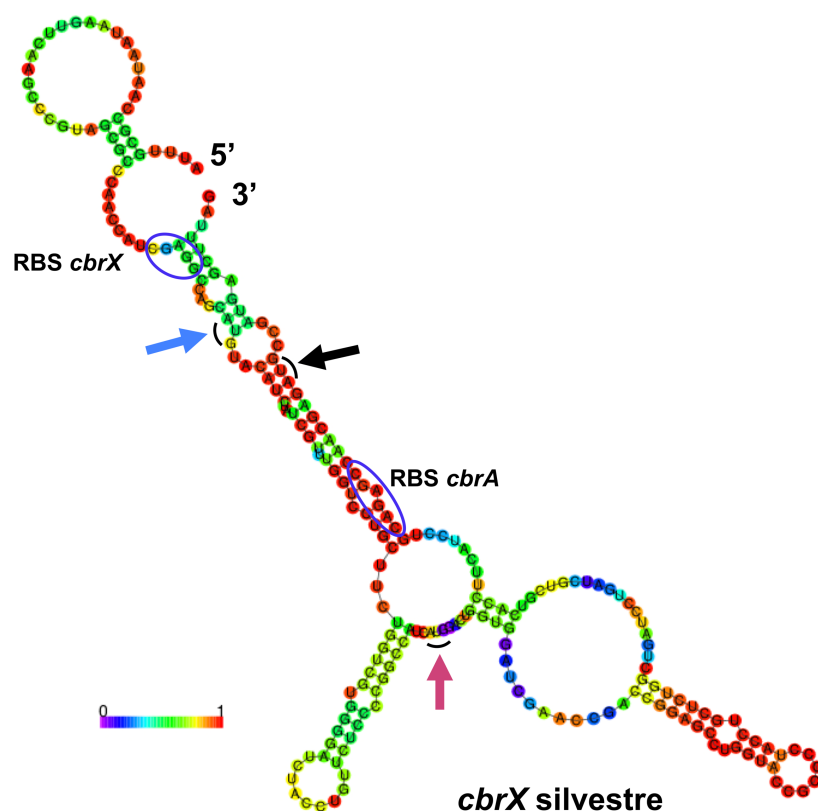
#### 4.1.2.2. Predicción de la estructura secundaria del ARNm de *cbrXA*

El mecanismo de control de la expresión de un gen a nivel post-transcripcional, basado en la obstrucción de la unión del ribosoma al RBS a causa de la presencia de una estructura secundaria intramolecular en el ARNm, que impide la traducción del gen adyacente, está bien descrito en la bibliografía (Madhushani et al., 2015; Prévost et al., 2007; Sonnleitner et al., 2011; Soper & Woodson, 2008; Večerek et al., 2007). Para superar este control es inevitable un acoplamiento traduccional con el gen localizado aguas arriba, ya que se requiere la traducción de la primera *orf*, para que el ribosoma pueda acceder al RBS y permita traducir la segunda pauta abierta de lectura.

Como se ha mostrado anteriormente, la secuencia codificante de *cbrX* se encuentra solapada en 17 pb con la de *cbrA*. En la secuencia leader (5'UTR) del ARNm hemos identificado una posible secuencia *Shine-Dalgarno* conservada para *cbrX* (TCGAGG) y otra no tan conservada 7 pb aguas arriba de *cbrA* (CAGAGC) (Figura 25). Para poder interpretar un posible mecanismo de acoplamiento traduccional entre *cbrX* y *cbrA* se realizó una predicción de la estructura secundaria de su ARNm a partir de la secuencia completa de *cbrX*



incluyendo la región solapada con el inicio de traducción de *cbrA* empleando la herramienta RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Lorenz et al., 2011).



**Figura 28. Predicción de estructura secundaria del ARNm de la secuencia de *cbrXA*.** Los colores indican la frecuencia en escala de 0 a 1 de que los nucleótidos se encuentren en la forma, apareada o libre, indicada en la estructura. En el caso de las bases libres, se indica la probabilidad de que permanezcan sin aparear. Los codones de inicio de la traducción se simbolizan mediante flechas, negra: ATG de *cbrA*, azul: ATG1 de *cbrX*, rosa: ATG2 de *cbrX*. Las posibles *Shine-Dalgarno* de *cbrX* y *cbrA* se representan rodeadas en azul.

El análisis de la estructura secundaria del ARNm de la secuencia silvestre de *cbrX* mostró que tanto el inicio de traducción como la posible *Shine-Dalgarno* de *cbrA* están ubicados en una región fuertemente apareada y con baja probabilidad de desnaturalizar (Figura 28) provocando un enmascaramiento del RBS de *cbrA* que podría estar haciéndolo inaccesible para el ribosoma, lo que sugiere con elevada probabilidad un acoplamiento traduccional. Para validar esta hipótesis, se realizará una serie de mutaciones puntuales en la secuencia de *cbrX* y se monitorizará la expresión de *cbrA* (véase apartado 4.1.3.3.).

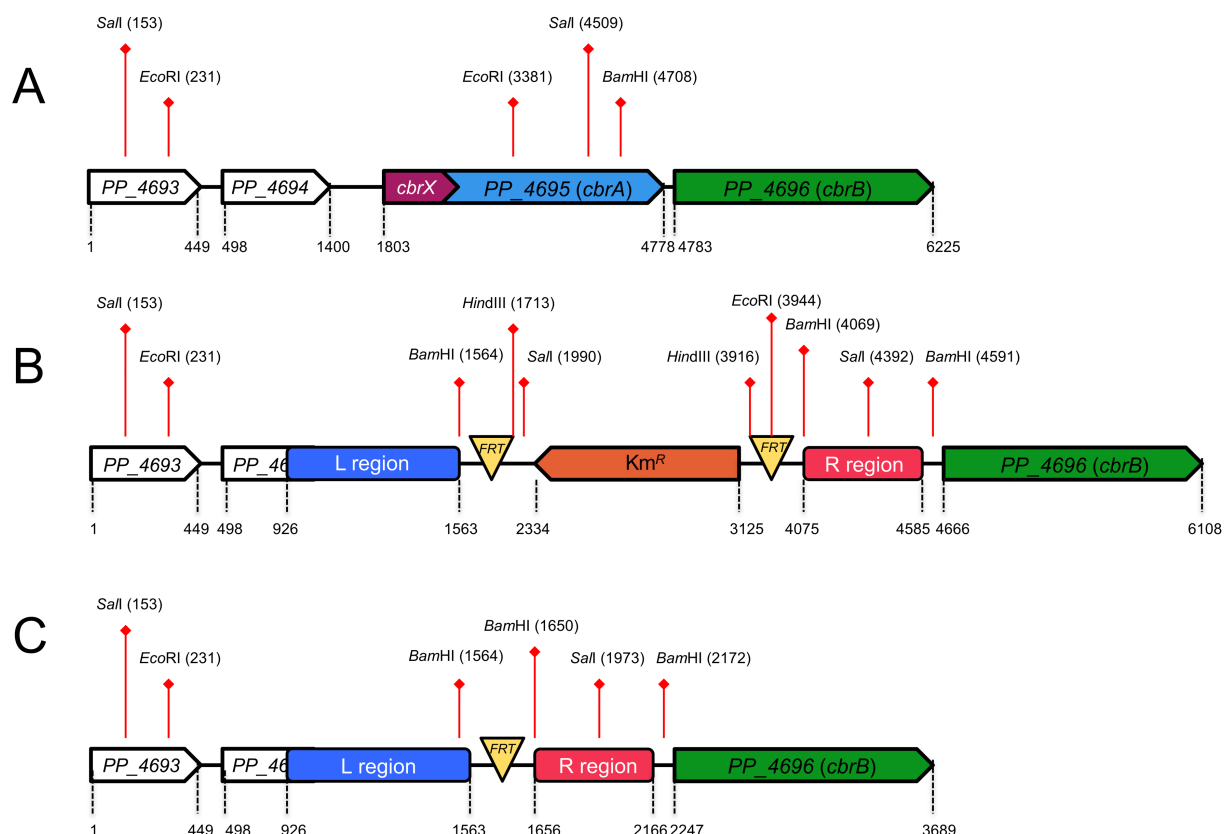
#### 4.1.3. Caracterización de la función de *cbrX* sobre el sistema Cbr en *P. putida*

La generación de nuevas herramientas bioinformáticas de predicción de nuevas pautas abiertas de lectura permite prever nuevos elementos reguladores desconocidos en los genomas de muchas bacterias. La identificación de la *orf cbrX* en el genoma de *P. putida* y el hecho de que hasta la fecha no se había caracterizado su función en ningún otro organismo, hace que la caracterización funcional de este elemento constituya uno de los objetivos más ambiciosos de este trabajo.

La ausencia de información hasta la fecha sobre *cbrX* promueve su caracterización funcional, con el fin de descubrir su participación como péptido en la recepción/transducción de la señal, o bien, como elemento regulador del sistema Cbr dado su evidente solapamiento traduccional con el gen adyacente, *cbrA*. Las peculiaridades en la localización genómica de *cbrX* recuerda a otros casos documentados de pequeñas *orfs* acopladas traduccionalmente con el gen adyacente, que actúan como interruptores que median la expresión del gen colindante en condiciones específicas (Madhushani et al., 2015; Sonnleitner et al., 2011). La aproximación experimental para iniciar su estudio fue la construcción y caracterización de un mutante de delección completa del locus *cbrX-cbrA* y, seguidamente, su complementación con las secuencia silvestre y versiones portadoras de mutaciones en residuos críticos, para definir su función a nivel de expresión de CbrA y de activación global del sistema Cbr.

##### 4.1.3.1. Construcción de un mutante de delección de *cbrX-cbrA* ( $\Delta cbrXA$ , MPO494) de *P. putida* KT2442

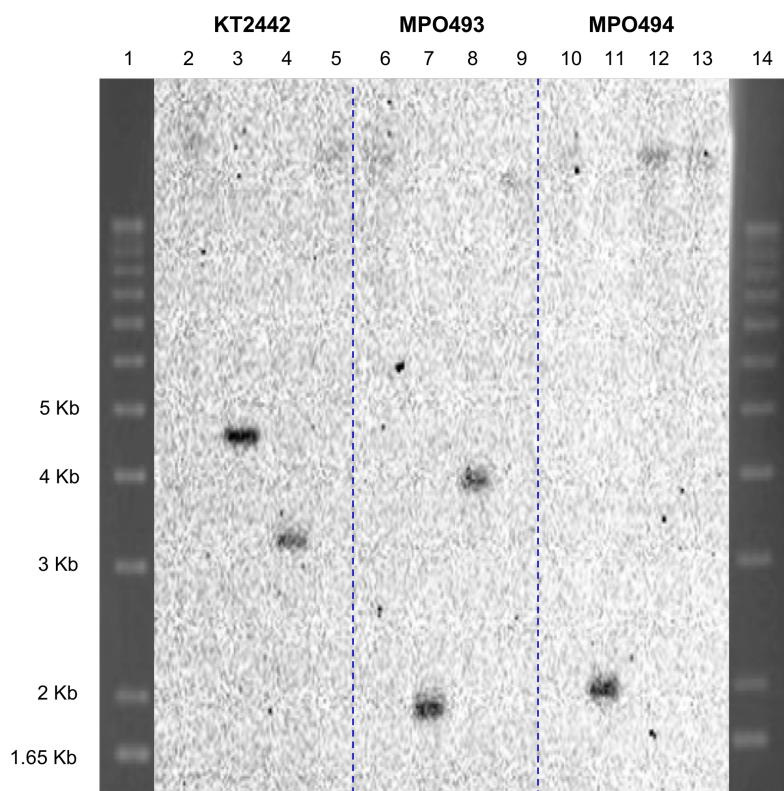
La construcción del mutante de delección completa de *cbrX* y *cbrA*, que incluye su promotor en *P. putida*, denominado MPO494, tuvo lugar mediante intercambio alélico de marcadores según se detalla en el apartado 3.3.1. de materiales y métodos. Una vez construido el mutante, se procedió a la verificación de la correcta organización genómica tras el doble evento de recombinación en los mutantes MPO493 y MPO494 mediante PCR y *Southern blotting*. En base al mapa de restricción de las cuatro enzimas seleccionadas *Bam*HI, *Sal*I, *Eco*RI e *Hind*III, se estableció el patrón de bandas para los fondos genéticos KT2442, MPO493 y MPO494 con la hibridación de una sonda homóloga a la región flanqueante izquierda al gen *cbrA* (Figura 29).



**Figura 29. Patrón de restricción en *P. putida* KT2442 y los mutantes MPO493 y MPO494 tras la digestión con las enzimas *Bam*HI, *Sal*I, *Eco*RI e *Hind*III.** El diagrama representa el contexto genómico del locus *cbrX-cbrA-cbrB* en el organismo silvestre (A), en el mutante de delección con el casete FRT-kanamicina-FRT integrado (MPO493) (B) y en el mutante de delección  $\Delta cbrX-cbrA$  después de la escisión del módulo de kanamicina (MPO494) (C). Las dianas de restricción se simbolizan como flechas verticales en rojo y sus coordenadas entre paréntesis. La secuencia aguas arriba al gen deletado se representa en azul como L-region y la secuencia aguas abajo a dicho gen en rosa como R-region. Las regiones de reconocimiento de la flipasa (FRT) se representan a través de triángulos amarillos. El diagrama no se muestra a escala.

La digestión del ADN cromosómico de la estirpe silvestre *P. putida* KT2442 y los mutantes MPO493 y MPO494 con las enzimas *Bam*HI, *Sal*I, *Eco*RI e *Hind*III debe generar un patrón de restricción teórico resumido en la figura 29. La restricción con *Bam*HI da lugar a las bandas 2.5 kb y 522 pb en la estirpe MPO493 (Figura 29 B) y dos bandas de 522 pb y 86 pb en la estirpe MPO494 (Figura 29 C). La digestión con *Sal*I genera una banda de 4.3 kb en la estirpe silvestre (Figura 29 A), dos bandas de 2.4 kb y 1.8 kb en el mutante MPO493 y una única banda de 1.8 kb en el mutante MPO494 a causa de la pérdida de la diana *Eco*RI tras la escisión del marcador de resistencia a kanamicina mediante el sistema de la flipasa-FRT. Por último, la enzima *Eco*RI genera un patrón de bandas de 3.1 kb en el organismo silvestre y 3.7

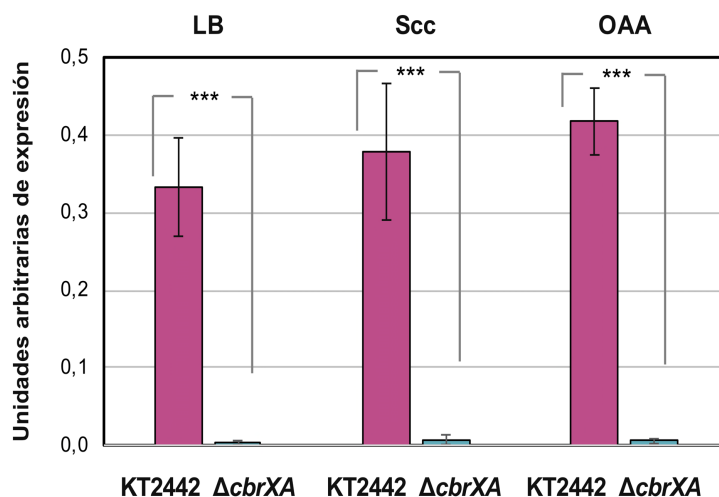
kb en la estirpe MPO493 mientras que *HindIII* una banda de 2.2 kb únicamente en el mutante MPO493. De este modo, el patrón de bandas obtenidas en el *Southern blot* corresponden a las esperadas, lo que permite validar la correcta organización genómica del mutante de delección  $\Delta cbrXA$ , MPO494 (Figura 30).



**Figura 30. Análisis por *Southern blot* de las estirpes KT2442, MPO493 y MPO494.** Se muestra la hibridación con una sonda marcada con digoxigenina que contiene la región flanqueante izquierda (*cbrAL*) de *cbrXA* en una membrana que contiene el ADN cromosómico de las tres estirpes digerido con las enzimas *BamHI*- (carriles 2, 6 y 10), *Sall*- (carriles 3, 7 y 11), *EcoRI*- (carriles 4, 8 y 12) e *HindIII*- (carriles 5, 9 y 13). El tamaño de las bandas esperadas para la digestión con *Sall* fueron 4.3, 1.8 y 1.8 kb para KT2442, MPO493 y MPO494, respectivamente, y en la digestión con *EcoRI* de 3.1 kb para KT2442 y de 3.7 kb para el mutante MPO493. El marcador de peso molecular se cargó en los carriles 1 y 14.

Para comprobar que la expresión de *cbrA* en el mutante MPO494 se veía reducida, se cuantificó su expresión mediante RT-qPCR con los oligonucleótidos *cbrA1/cbrA2Q* que hibridan en una región presente en el mutante  $\Delta cbrXA$ , localizada entre los dominios TM y PAS de *cbrA* (coordenadas +1753 y +1821 desde el ATG).

Como se observa en la figura 31, los niveles de expresión alcanzados en el mutante  $\Delta cbrXA$  fueron indetectables en los tres medios analizados (LB, Scc y OAA) en comparación con la estirpe silvestre lo que confirmó que no había expresión de *cbrA* en el mutante MPO494.



**Figure 31. Análisis *in vivo* de la expresión de *cbrA* en la estirpe MPO494 ( $\Delta cbrXA$ ).** Niveles de expresión de *cbrA* obtenidos por RT-qPCR en las estirpes silvestre KT2442 (barras rosas) y MPO494 ( $\Delta cbrXA$ , barras azules) cultivadas en LB (izquierda) y en medio mínimo con succinato (Scc, centro) y con oxalacetato (OAA, derecha). Los valores son la media de tres ensayos independientes con tres réplicas biológicas y las barras de error indican la desviación estándar de las medias. Las estrellas representan los *p*-values obtenido tras aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.005$ .

#### 4.1.3.2. Caracterización fenotípica del mutante MPO494 ( $\Delta cbrXA$ ) y complementación cromosómica

Para demostrar que los fenotipos del mutante MPO494 eran consecuencia directa de la ausencia de *cbrX* y *cbrA*, se procedió a su complementación con las copias silvestres de ambos genes. Para ello se realizó la integración en el sitio *glmS* del cromosoma de la secuencia de *cbrXA* contenida en el plásmido pMPO1317 (véase apartado 3.3.2. de materiales y métodos). La estirpe resultante por la integración en el sitio Tn7 se denominó MPO498. Como control se integró una copia del plásmido vacío (pME6182) en las estirpes silvestre KT2442 y mutante MPO494 para generar las estirpes MPO451 y MPO495, respectivamente.

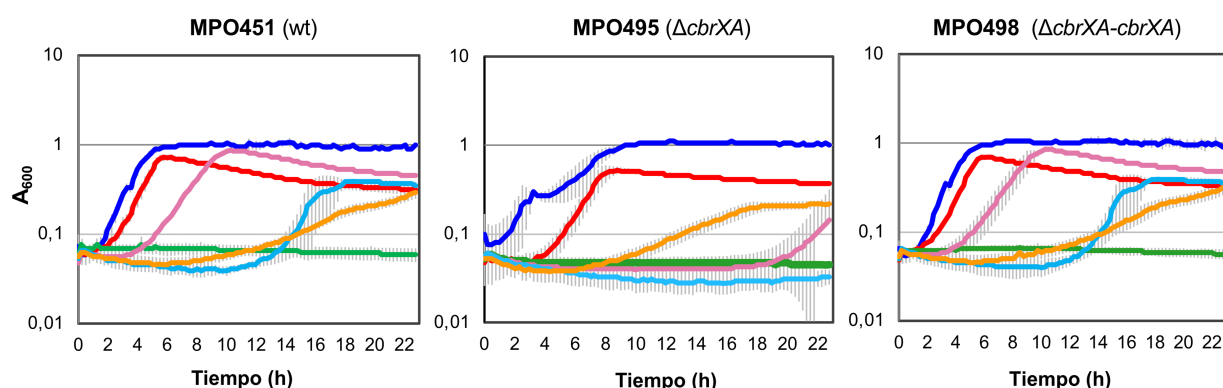
#### 4.1.3.2.1. Utilización de distintas fuentes de carbono por las estirpes KT2442, MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ) y MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ )

Para comprobar si la carencia de *cbrX* y/o *cbrA* tenía algún efecto en la utilización de distintas fuentes de carbono, se analizó el crecimiento de las estirpes silvestre MPO451 y mutantes MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ) y MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ ) en un medio rico LB, donde Hfq/Crc ejerce represión catabólica, y en un medio mínimo con fuentes no preferenciales de carbono como succinato, oxalacetato, citrato, histidina o glucosa. Se monitorizó el crecimiento a lo largo del tiempo en cultivo líquido en placas multipocillos (Figura 32) gracias a que permite obtener una cinética de crecimiento más detallada con la monitorización automática de un número superior de muestras y también, estimar los tiempos de generación de una forma mucho más precisa.

En la estirpe silvestre MPO451, el crecimiento más rápido se observó en medio LB y succinato alcanzando la fase exponencial entorno a las 0.75-1 h con unos tiempos de generación de 0.33 h y 0.39 h, respectivamente. Por otro lado, la asimilación de citrato, histidina y glucosa fue gradual con una duración de la fase de latencia superior, de 4 h, 13.5 h y 13 h, respectivamente. El tiempo de generación en histidina fue tan corto como en los medios más ricos una vez se inició el crecimiento (0.43 h), mientras que el tiempo de generación en citrato aumentó hasta 0.56 h y en glucosa hasta 3.13 h (Figura 32 B). Ninguna de las estirpes fue capaz de utilizar el oxalacetato como fuente de carbono durante las 23 h del experimento, mostrando un crecimiento nulo.

El mutante MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ), manifestó un pequeño retraso en su crecimiento en medio LB respecto a la estirpe silvestre, potenciado en la fase exponencial tardía (0.85 h vs 0.50 h de la fase temprana). Como consecuencia, alcanzó su máximo de crecimiento 4 h más tarde que la estirpe silvestre MPO451. El tiempo de generación del mutante MPO495 en succinato no se vio alterado respecto a la estirpe silvestre (0.45 vs 0.39 del wt) (Figura 32 A), pero la fase de latencia sufrió un retraso de 3 h, mostrando así un tiempo más largo para la adaptación a las nuevas condiciones (Figura 32 B). Sin embargo, MPO495 crece incluso algo mejor en glucosa cuando se compara con el organismo silvestre. El fenotipo de crecimiento del mutante de delección  $\Delta cbrXA$  fue mucho más patente en MM con histidina, que no fue capaz de asimilar, y en MM con citrato en el que se observó una fase lag muy prolongada, aunque finalmente fue capaz de iniciar su crecimiento. Esto indica una clara dependencia del sistema Cbr para utilizar estos metabolitos.

A



B

	LB	Scc	OAA	Cit	His	Glu
<b>MPO451</b>	0.33-0.43* h (0.75 h)	0.39 h (1 h)	NC	0.56 h (4 h)	0.43 h (13.5 h)	3.13 h (13 h)
<b>MPO495</b>	0.50-0.85* h (0.75 h)	0.45 h (4 h)	NC	-	NC	2.09 h (11 h)
<b>MPO498</b>	0.31-0.51* h (0.75 h)	0.40 h (1 h)	NC	0.64 h (4 h)	0.39 h (13.5 h)	2.90 h (13 h)

**Figura 32. Crecimiento de *P. putida* KT2442, mutante de delección  $\Delta cbrXA$  y mutante complementado  $\Delta cbrXA-cbrXA$  en diferentes fuentes de carbono. (A)** Curvas de crecimiento de la estirpe silvestre (MPO451), mutante de delección (MPO495) y mutante de delección complementado con la secuencia *cbrX-cbrA* (MPO498) en medio LB (azul) y medio mínimo con succinato (Scc, rojo), oxalacetato (OAA, verde), citrato (Cit, rosa), histidina (His, celeste) y glucosa (Glu, naranja) como fuentes de carbono. Las gráficas corresponden a un ensayo representativo de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. **(B)** Tiempos de generación y fase de latencia (entre paréntesis) de las estirpes MPO451, MPO495 y MPO498 en medio rico (LB), y medio mínimo M9 con succinato (Scc), oxalacetato (OAA), citrato (Cit), histidina (His) y glucosa (Glu) como fuentes de carbono. La fase de latencia en cada condición ensayada se indica entre paréntesis, el tiempo de generación en fase exponencial tardía como asterisco (\*), la ausencia de crecimiento como NC y el crecimiento después de 20 h como -. El tiempo de generación se estimó durante la fase exponencial de crecimiento como una extrapolación de la ecuación exponencial.

La estirpe complementada MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ ), recuperó la capacidad para utilizar las distintas fuentes de carbono de manera tan eficiente como la estirpe silvestre MPO451, indicando así una eficaz complementación con la secuencia *cbrX-cbrA* insertada en el cromosoma.

De forma complementaria se validó el crecimiento de estas mismas estirpes en cultivos en matraces para comprobar los datos de crecimiento ensayados en placas multipocillos, donde la agitación y aireación están limitadas. Las estirpes mostraron un comportamiento

equivalente en los medios correspondientes, validando así los resultados obtenidos (datos no mostrados).

Los datos de estos experimentos permiten concluir que CbrA participa en el proceso de asimilación de las fuentes de carbono ensayadas dado la eficiente recuperación del fenotipo silvestre del mutante de delección MPO495 tras su complementación con la copia silvestre *cbrX-cbrA*. Además, es interesante destacar que tanto el mutante  $\Delta cbrXA$  como el mutante  $\Delta cbrB$  comparten el mismo fenotipo en lo que respecta al uso de las distintas fuentes de carbono ensayadas (Amador et al., 2010, 2016).

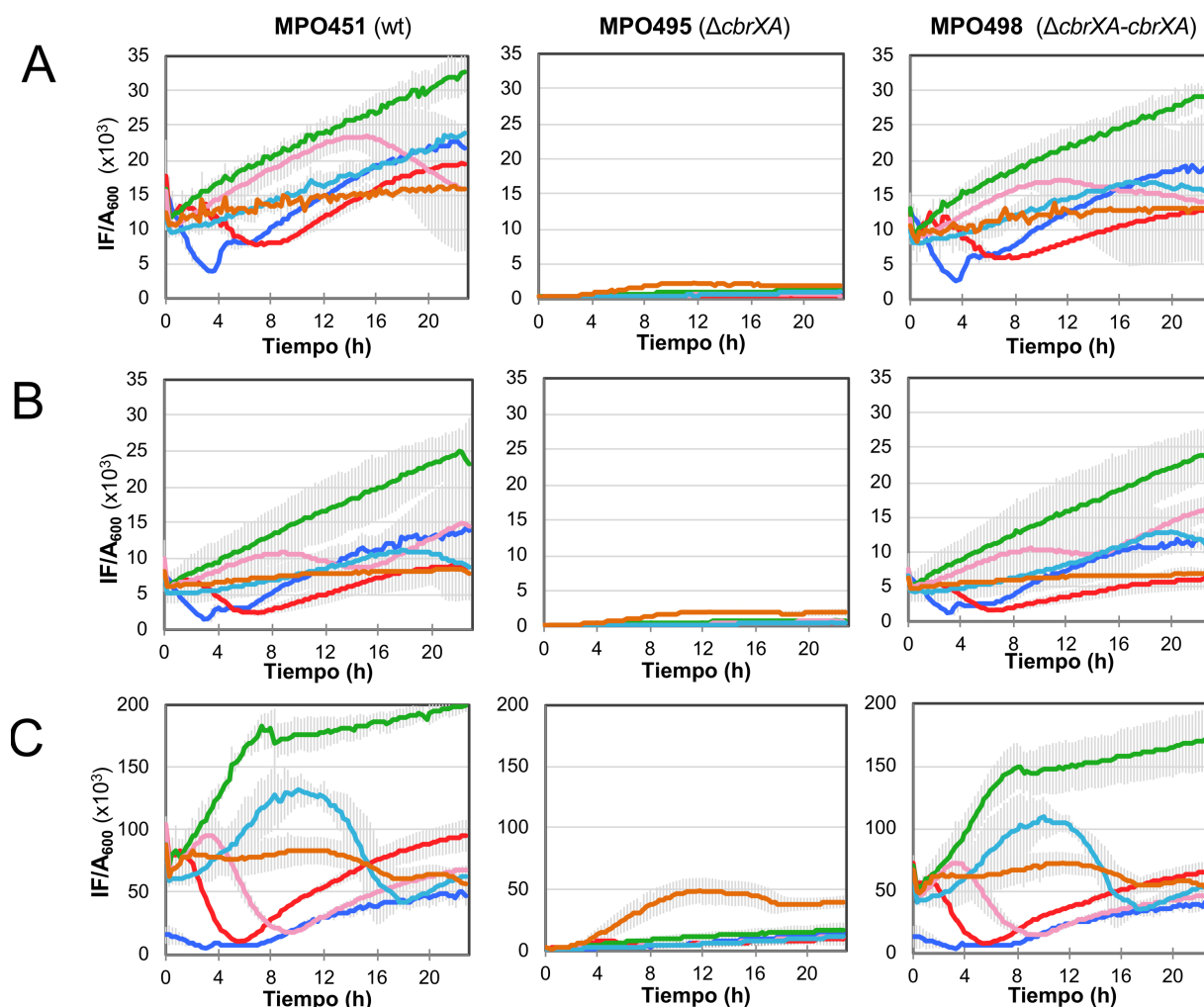
#### 4.1.3.2.2. Determinación de las condiciones de activación del sistema Cbr

El objetivo de este apartado fue determinar las condiciones de máxima inducción del sistema en *P. putida* mediante el estudio de la activación transcripcional por parte de CbrB (a través de CbrA) de tres de los genes diana, *crcZ*, *crcY* y *PP2810*. Para ello se construyeron fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de estos genes al gen reportero *gfpmut3*, que a su vez se encontraba fusionado transcripcionalmente a *lacZ*. Las regiones clonadas en concreto contenían las secuencias comprendidas entre las coordenadas -298, -195 y -472 hasta la posición +1 para *crcZ*, *crcY* y para *PP2810* en el plásmido pMRB1, dando lugar a los plásmidos pMPO356, pMPO357 y pMPO355, respectivamente (véase apartado 3.4.1. de materiales y métodos). Hay que resaltar que las fusiones transcripcionales para los ARNm de *CrcZ* y *CrcY* se realizaron a la posición +1, dado que aguas abajo de esa posición se localizan sendas cajas CA, posibles sitios de unión de Hfq/Crc. Para evitar una posible interferencia con alteraciones en la estabilidad del ARNm, se eliminaron estas regiones por completo.

Las fusiones transcripcionales  $P_{crcZ}::gfpmut3::lacZ$ ,  $P_{crcY}::gfpmut3::lacZ$  y  $P_{PP2810}::gfpmut3::lacZ$  se introdujeron en los fondos genéticos silvestre MPO451 y mutante MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ) con el plásmido vacío pME6182 integrado en el sitio de Tn7 y también en el mutante complementado MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ ). Entonces, se analizó su crecimiento e intensidad de fluorescencia como medida de expresión en placas multipocillos en un medio rico LB y en medio mínimo con las mismas 5 fuentes de carbonos (succinato, oxalacetato, citrato, histidina y glucosa) evaluadas en el apartado anterior. Con este experimento se pudo obtener de manera simultánea, la cinética de crecimiento y la inducción del sistema Cbr. Además, la cuantificación de la fluorescencia emitida por las fusiones transcripcionales a *gfpmut3*, permitió determinar las condiciones y la fase de crecimiento correspondiente donde se alcanzaban los niveles máximos de activación de CbrB.

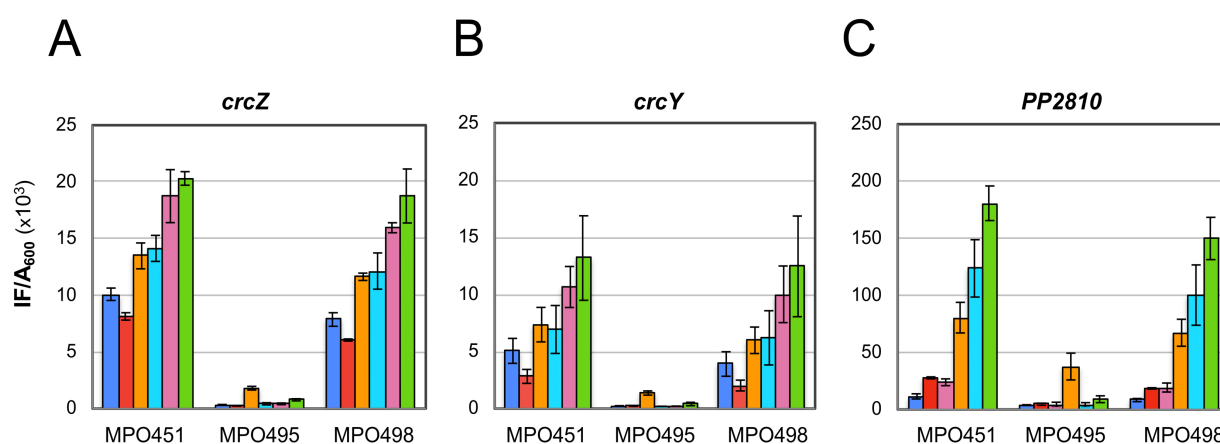


Los datos de actividad, expresados como fluorescencia específica, se representaron como la intensidad de fluorescencia (IF) emitida por *gfp* normalizada por la  $A_{600}$  de cada organismo a lo largo del tiempo (Figura 33).



En el apartado anterior se estableció una jerarquía en la asimilación de fuentes de carbono en la estirpe silvestre MPO451, que se correlaciona con la velocidad de crecimiento en las distintas condiciones. Aquellas fuentes de carbono preferenciales como las presentes en LB y succinato fueron rápidamente asimilables, mientras que las fuentes de carbono no preferenciales como citrato, histidina, glucosa mostraron un menor crecimiento. Finalmente, ninguna de ellas fue capaz de utilizar el oxalacetato como fuente de carbono, por lo que no se observó crecimiento transcurridas las 23 h (Figura 32). Los niveles de fluorescencia específica más elevados correspondieron a aquellas fuentes de carbono en las cuales las bacterias experimentaron un crecimiento más lento, como en oxalacetato, citrato e histidina (Figura 33).

La figura 34 representa los niveles de inducción de *crcZ*, *crcY* y *PP2810* de la figura 33 a las 8 h de crecimiento, momento en el que se aprecian las máximas diferencias en la inducción entre distintas estirpes y medios.



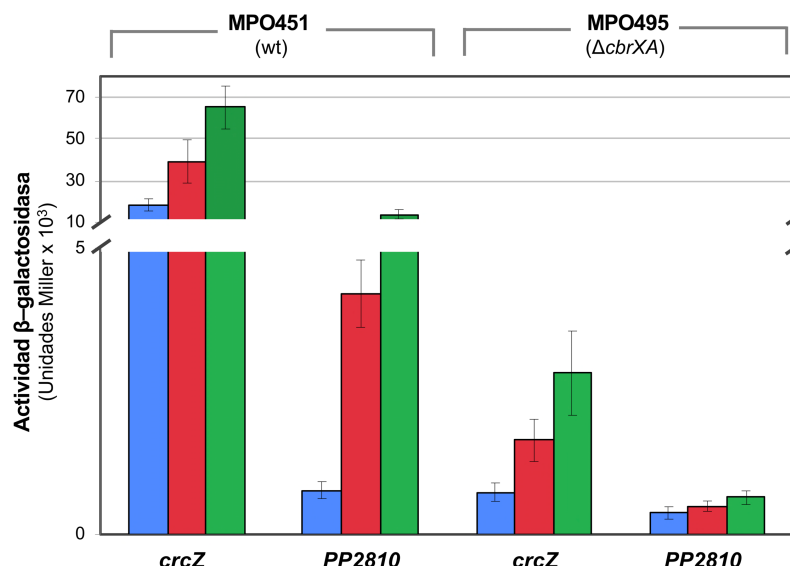
**Figura 34. Niveles de expresión de *crcZ*, *crcY* y *PP2810* en *P. putida* KT2442, mutante  $\Delta cbrXA$  y mutante complementado a las 8 h de inducción en diversas fuentes de carbono.** Los niveles de expresión se representan como intensidad de fluorescencia (IF) emitida por *gfp* normalizada por la densidad óptica  $A_{600}$  para las estirpes silvestre (MPO451),  $\Delta cbrXA$  (MPO495) y  $\Delta cbrXA-cbrXA$  (MPO498) conteniendo las fusiones transcripcionales de *crcZ* (A), *crcY* (B) y *PP2810* (C) a *gfpmut3::lacZ* en los plásmidos pMPO356, pMPO357 y pMPO355, respectivamente. Las gráficas representan los niveles de expresión de cada gen después de 8 h de inducción en LB (azul) y medio mínimo con succinato (Scc, rojo), oxalacetato (OAA, verde), citrato (Cit, rosa), histidina (His, celeste) y glucosa (Glu, naranja) como fuentes de carbono. La ganancia en la medida de fluorescencia para *crcZ* y *crcY* fue de 35, y para *PP2810* de 55, por lo que los niveles de expresión de *crcZ* y *crcY* no son comparables a los de *PP2810*. Se muestra un experimento representativo de tres réplicas biológicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas técnicas para la réplica biológica mostrada.

Uno de los efectos más evidentes observados es la expresión diferencial de los genes *crcZ*, *crcY* y *PP2810* en LB y en medio mínimo con las distintas fuentes de carbono. En el fondo silvestre MPO451, los tres genes diana mostraron el mismo patrón de expresión, detectándose la máxima inducción en condiciones en las que estaban presentes fuentes de carbono no preferenciales. Estos datos son completamente coherentes con la actividad  $\beta$ -galactosidasa medida para los mismos genes descritos anteriormente (Valentini et al., 2014), lo que revela que la medida de la expresión como intensidad de fluorescencia de las fusiones transcripcionales a *gfp* es lineal y reproducible. La condición con los niveles más elevados de expresión para los tres genes dianas fue el medio con oxalacetato como fuente de carbono, seguido de histidina, citrato y glucosa y, finalmente succinato, como la condición más represora en medio mínimo. El medio rico LB reflejó el mismo grado de represión que el medio mínimo con succinato -a pesar de ser la fuente preferentemente asimilable en *Pseudomonas*- posiblemente a la autofluorescencia intrínseca del medio rico de modo que no se puede establecer una comparación entre ellos.

Hay que resaltar que existe una diferencia en la escala en las gráficas de la figura 33 y, además, que las condiciones de la ganancia en la medida de fluorescencia para *crcZ*, y *crcY* no se corresponden con la de *PP2810*, por sus altos niveles de expresión. Sin embargo, la interpretación de las gráficas permite describir que la inducción de *PP2810* se produce de una forma más gradual en las distintas fuentes de carbono, que *crcZ* y *crcY*.

Por un lado, la expresión de *crcZ* y *crcY* muestra una eficiente activación mediada por Cbr en medios que permiten un crecimiento rápido (LB, MM con Scc o incluso Cit) es bastante mayor que la de *PP2810*. Comparando los niveles del silvestre con los del mutante se observa una activación muy evidente de estos genes en estos medios. De forma similar, si comparamos los niveles de *crcZ* y *crcY* en estos medios con los máximos niveles que se obtienen en un medio pobre, se observa que están ya inducidos muy sustancialmente incluso en medio rico LB (Figuras 34-35). Esto sugiere que son genes cuya activación precisa de bajas dosis de CbrB activo. Por el contrario, los niveles relativos de *PP2810* en los medios que favorecen un crecimiento rápido son muy inferiores a los de *crcZ* y *crcY* con lo que el número de veces de inducción entre los distintos medios es mucho más evidente, lo que sugiere que para activar *PP2810* eficazmente se requiere un mayor nivel de actividad de CbrB (Figura 35). Si se compara los valores de la condición de máxima inducción (oxalacetato) con la condición más represora (succinato) a las 8 h, el número de veces de inducción entre ambas en el fondo silvestre fue de 6.5 veces para *PP2810* con respecto a 2.4 veces para *crcZ* y 4.6 veces para *crcY* (Figura 34). Además, los niveles basales en una fuente represora como LB o succinato fueron más bajos que en el caso de *crcZ* o *crcY*, que se encontraban parcialmente

desreprimidos en estas condiciones (Figura 35). De este modo, el gen *PP2810* proporcionó una óptima capacidad para discriminar entre fuentes de carbono maximizando las diferencias de expresión dependiendo de la fuente de carbono presente en el medio.



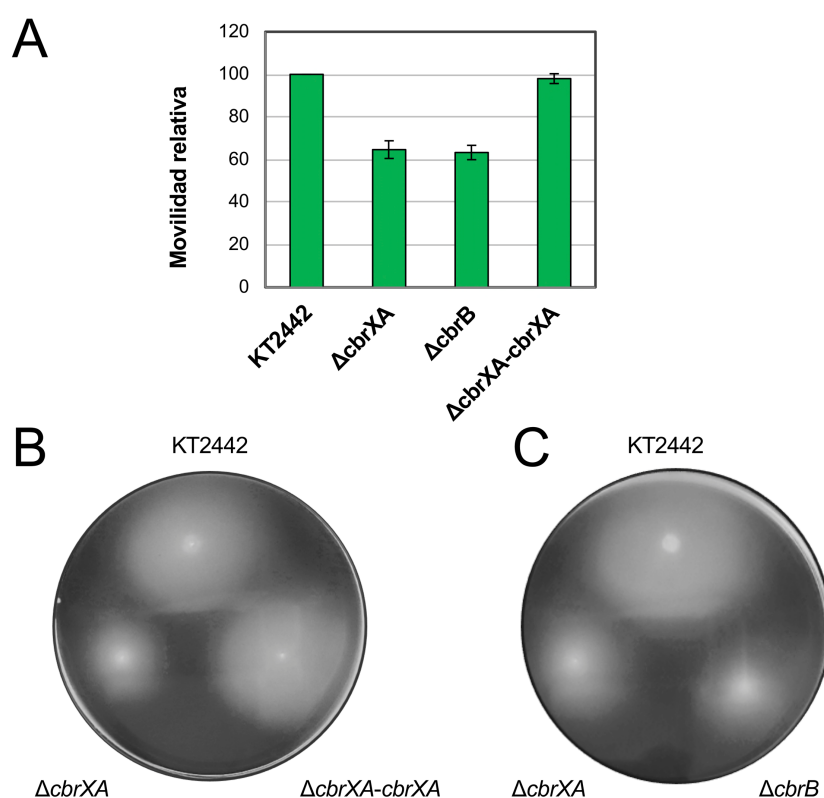
**Figura 35. Niveles de expresión de *crcZ* y *PP2810* en *P. putida* KT2442 y en el mutante  $\Delta cbrXA$ .**

Medida de la actividad β-galactosidasa de las fusiones transcripcionales  $P_{crcZ}::lacZ$  (pMPO1316) y  $P_{PP2810}::lacZ$  (pMPO420) en las estirpes MPO451 (silvestre, wt) y MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ). Se monitorizó la actividad en medio LB (barras azules) y medio mínimo suplementado con succinato (barras rojas) u oxalacetato (barras verdes). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes.

Los resultados presentados en las figuras 33, 34 y 35 demuestran la total dependencia de los genes *crcZ*, *crcY* y *PP2810* del sistema Cbr, puesto que los niveles de expresión en un fondo genético mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO495) son despreciables, observándose una recuperación de los niveles de expresión de los tres genes en la estirpe complementada, MPO498, hasta los valores de activación alcanzados por la estirpe silvestre en todos los medios y condiciones, lo que demuestra nuevamente una eficiente complementación. El único medio en el cual el mutante MPO495 presentó unos niveles de expresión de *PP2810* claramente superiores fue en medio mínimo con glucosa, en comparación con el resto de las fuentes de carbono, lo cual indicaría la participación de otro tipo de regulación adicional ejercida por otro sistema de control en este operón y en este medio (Figura 34).

#### 4.1.3.2.3. Movilidad por *swimming*

Como hemos mencionado previamente, un mutante de delección en *cbrB* presenta un fenotipo de crecimiento similar al mutante  $\Delta cbrXA$ , así como deficiencias en procesos de movilidad, quimiotaxis o tolerancia a metales, entre otros (Amador et al., 2010, 2016). Para determinar si la carencia de la histidina quinasa CbrA se traduce en un efecto de carencia de CbrB, al no ser activado mediante fosforilación por CbrA, se comparó otro fenotipo como el de movilidad en los mutantes  $\Delta cbrB$  (MPO401),  $\Delta cbrXA$  (MPO494) y la estirpe MPO498 ( $\Delta cbrXA$ -*cbrXA*) usando como referencia a la estirpe silvestre *P. putida* KT2442. De este modo, se realizaron ensayos de movilidad por *swimming* en agar blando al 0.3 % en LB y se cuantificó la distancia entre el punto de inoculación y la migración obtenida tras 20 h de incubación a 30 °C (Figura 36).



**Figura 36. Ensayo de movilidad por *swimming* en agar blando.** (A) Representación de la movilidad relativa de las estirpes MPO494 ( $\Delta cbrXA$ ), MPO401 ( $\Delta cbrB$ ) y MPO498 ( $\Delta cbrXA$ -*cbrXA*) respecto al organismo silvestre *P. putida* KT2442 en placas de LB agar blando al 0.3%. Los datos son los valores de la media de al menos tres réplicas biológicas con sus correspondientes desviaciones estándar. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 20 h antes de cuantificar la movilidad relativa. En los paneles inferiores se muestra una réplica representativa de las estirpes mutante  $\Delta cbrXA$  y mutante complementado (B) y mutante  $\Delta cbrXA$  y mutante  $\Delta cbrB$  (C) con respecto a la estirpe silvestre.

Como se observa en la figura 36, la movilidad de los mutante  $\Delta cbrXA$  y  $\Delta cbrB$  se vio reducida en un 64.6 % y 63.3 %, respectivamente con respecto al silvestre, lo que sugiere que la alteración en la movilidad en el mutante  $\Delta cbrB$  es debida a la falta de fosforilación por parte de CbrA. La carencia de CbrA y, por consiguiente, la incapacidad de activar a CbrB, es responsable del defecto en la movilidad en *P. putida*. De nuevo, la complementación del mutante  $\Delta cbrXA$  con una copia silvestre del gen en el sitio Tn7 del cromosoma permitió recuperar eficientemente (98 %) la movilidad del mutante de delección.

#### 4.1.3.3. Estudio del efecto regulador de *cbrX* sobre la expresión de *cbrA*

A nivel molecular, el análisis del contexto genómico de *cbrX* y su conservación entre las distintas categorías taxonómicas, son claros indicios de que *cbrX* esta íntimamente relacionado con la regulación del sistema Cbr. Como abordaje inicial en la caracterización funcional de *cbrX* se determinó, en primer lugar, si participa en la modulación de la expresión del gen adyacente *cbrA*, y consecutivamente, si modula otros genes diana que conforman el regulón de CbrB. La otra hipótesis por comprobar sería que actuase como un péptido funcional independiente, que participe en el proceso de señalización a través de la histidina quinasa CbrA.

La información obtenida *in silico* de las pautas abiertas de lectura, mostraba que la secuencia de *cbrX* solapa con la de *cbrA* (Figura 25), y la predicción de la estructura secundaria del ARNm de *cbrXA*, revelaba la presencia de una estructura estable que parecía impedir el acceso de la subunidad pequeña del ribosoma a la RBS de *cbrA* para su traducción. Estos elementos indicaban un posible efecto de *cbrX* sobre la expresión de *cbrA*. Para profundizar en este aspecto se diseñaron construcciones del ARN mensajero de *cbrXA* en las que se introdujeron mutaciones puntuales en residuos importantes que implicaban un efecto en la traducción de *cbrX* o de *cbrA*. Estas mutaciones fueron (Figura 37):

- La sustitución del supuesto codón de inicio ATG1 de *cbrX* (ATG por GCA). Con esta mutación no se generaría CbrX.
- La sustitución de un posible segundo codón de inicio (ATG2) de *cbrX* (ATG por GAT) a 60 pb del primero y en la misma fase de lectura que ATG1. Se valora la posibilidad de que el ribosoma pueda reconocer este codón como posible inicio de la traducción.
- La sustitución simultánea de ATG1 y ATG2. Se garantiza que no hay posible inicio de la traducción de *cbrX*.

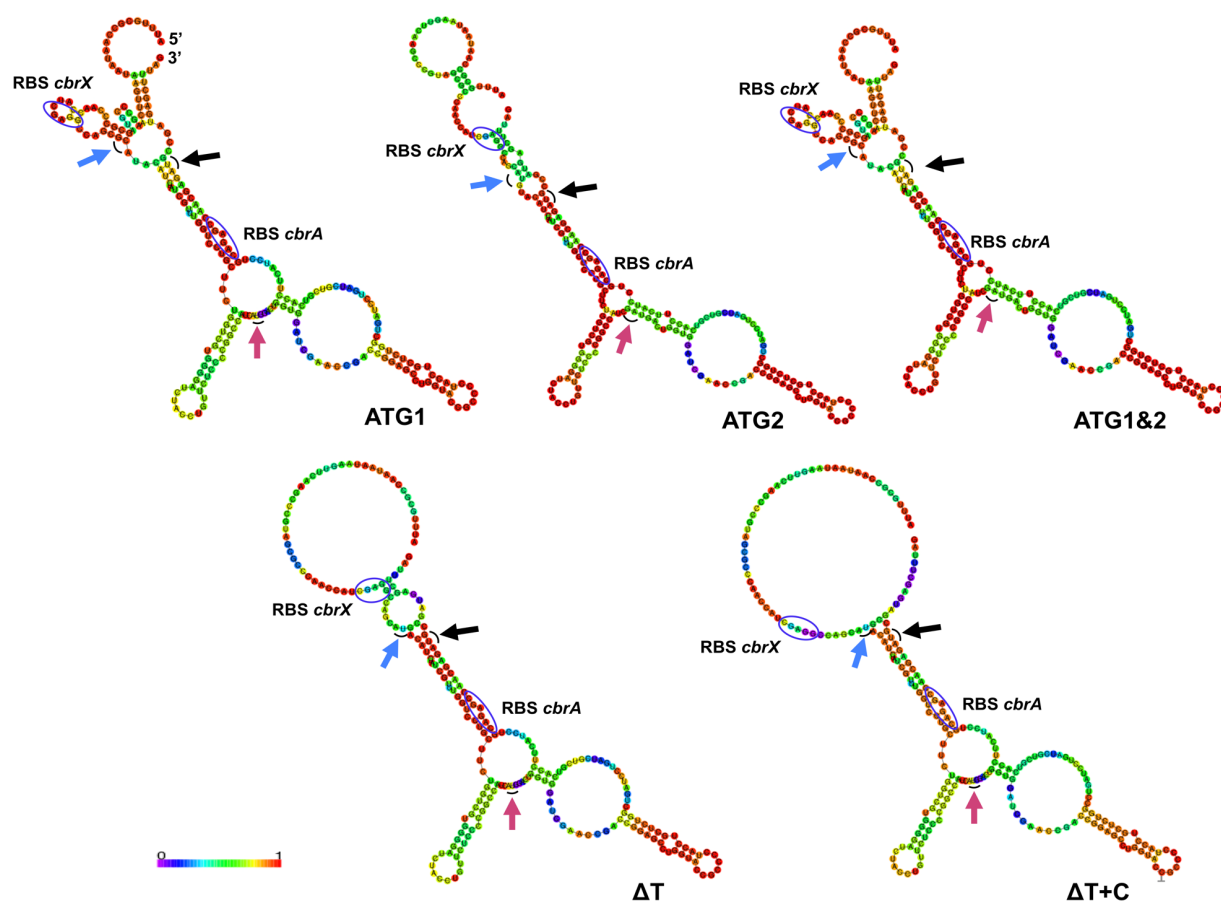
- d. La delección de una T (-1) en la posición +4 desde el ATG1 de modo que se genera un desfase en la pauta de lectura abierta de *cbrX*, que termina prematuramente. Esta mutación genera un péptido más corto y de secuencia distinta a CbrX.
- e. Sobre la construcción anterior (-1) se realizó la inserción de una C (+1) en la posición +118 de *cbrX*, compensando el desfase y restaurando la pauta de lectura abierta de *cbrX* silvestre. El resultado es que la traducción se termina en el mismo codón de terminación que en la secuencia silvestre, generando un péptido del mismo tamaño que CbrX pero con una secuencia diferente en su mayor parte.

		Fusión $\Delta$ - <i>lacZ</i>	Plásmido en Tn7 [Estirpe]
<i>cbrXA</i> (wt)	<b>ATG</b> TACATCTATCGTTTGGTCCTGCTTCTGGTCGTGGGGATCTACCTGTTCTCCCCGGCCATC <b>ATG</b> GACT GGTGGATCGAACCACCGGAGCCTGGTACCGCCCCCTACCTGCTCTGGCTGATCCTGATCGTCGTACCTT CATCCTGCAGAGCCAACGAG <b>ATGCCGATGAGCTTAG</b> ..  <b>MYIYRLVLLL</b> VVGIYLFSPAIDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL-	pMPO1370	pMPO1317 [MPO498]
(ATG1)	<b>SCA</b> TACATCTATCGTTTGGTCCTGCTTCTGGTCGTGGGGATCTACCTGTTCTCCCCGGCCATC <b>ATG</b> GACT GGTGGATCGAACCACCGGAGCCTGGTACCGCCCCCTACCTGCTCTGGCTGATCCTGATCGTCGTACCTT CATCCTGCAGAGCCAACGAG <b>ATGCCGATGAGCTTAG</b> ..  <b>AYIYRLVLLL</b> VVGIYLFSPAIDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL-	pMPO1371	pMPO434 [MPO497]
(ATG2)	<b>ATG</b> TACATCTATCGTTTGGTCCTGCTTCTGGTCGTGGGGATCTACCTGTTCTCCCCGGCCATC <b>GAT</b> GACT GGTGGATCGAACCACCGGAGCCTGGTACCGCCCCCTACCTGCTCTGGCTGATCCTGATCGTCGTACCTT CATCCTGCAGAGCCAACGAG <b>ATGCCGATGAGCTTAG</b> ..  <b>MYIYRLVLLL</b> VVGIYLFSPAIDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL-	pMPO1372	pMPO1344 [MPO513]
(ATG1&2)	<b>SCA</b> TACATCTATCGTTTGGTCCTGCTTCTGGTCGTGGGGATCTACCTGTTCTCCCCGGCCATC <b>GAT</b> GACT GGTGGATCGAACCACCGGAGCCTGGTACCGCCCCCTACCTGCTCTGGCTGATCCTGATCGTCGTACCTT CATCCTGCAGAGCCAACGAG <b>ATGCCGATGAGCTTAG</b> ..  <b>AYIYRLVLLL</b> VVGIYLFSPAIDWWIEPTGAWYRPYLLWLILIVVTFILQSQRDADEL-	pMPO1373	pMPO1349 [MPO514]
(-1)	<b>ATG</b> ACATCTATCGTTTGGTCCTGCTTCTGGTCGTGGGGATCTACCTGTTCTCCCCGGCCATC <b>ATG</b> GACT GGTGGATCGAACCACCGGAGCCTGGTACCGCCCCCTACCTGCTCTGGCTGATCCTGATCGTCGTACCTT CATCCTGCAGAGCCAACGAG <b>ATGCCGATGAGCTTAG</b> ..  <b>MTSIVWSCFW</b> SWGSTCSPRPSWTGGSNRPEPGTAPTCSG-	pMPO1374	pMPO1368 [MPO522]
(-1+1)	<b>ATG</b> ACATCTATCGTTTGGTCCTGCTTCTGGTCGTGGGGATCTACCTGTTCTCCCCGGCCATC <b>ATG</b> GACT GGTGGATCGAACCACCGGAGCCTGGTACCGCCCCCTACCTGCTCTGGCTGATCCTGATCGTCGTACCTT TCATCCTGCAGAGCCAACGAG <b>ATGCCGATGAGCTTAG</b> ..  <b>MTSIVWSCFW</b> SWGSTCSPRPSWTGGSNRPEPGTAPTCSG <b>LILIVVTFILQSQRDADEL</b> -	pMPO1259	pMPO1369 [MPO529]

**Figura 37. Mutagénesis puntual de la secuencia de *cbrX*.** Secuencia de ADN de *cbrX* y el extremo 5' de *cbrA* para la versión silvestre y las mutaciones ATG1, ATG2, ATG1&2, -1 y -1+1. Las sustituciones se indican en rojo, las delecciones se muestran como un guion rojo (—) y los codones de inicio y stop de *cbrX* y *cbrA*, en negrita y subrayados. La secuencia de *cbrX* que solapa con *cbrA* se indica en azul. Las secuencias de aminoácidos predichas para los péptidos traducidos se representan sombreadas en rosa debajo de la secuencia de ADN. Los residuos correspondientes a CbrX en la secuencia silvestre se destacan en negrita mientras que los aminoácidos en cursiva indican residuos que no coinciden con la secuencia silvestre de CbrX. A la derecha se indican los plásmidos con las fusiones traduccionales de *P<sub>cbrXA</sub>* al *lacZ* y los plásmidos con las secuencias *cbrX-cbrA* destinados a la integración en Tn7. Las estirpes  $\Delta$ *cbrXA* resultantes de la integración de estos plásmidos en el sitio de Tn7 se indican entre corchetes.

En todos los casos, la secuencia de *cbrA* se encontraba intacta, de modo que se podía estudiar el efecto de *cbrX* y sus versiones mutadas sobre su expresión a nivel traduccional y transcripcional.

La predicción de estructura secundaria de las secuencias que contenían mutaciones puntuales en la secuencia de *cbrX*, no provocaron alteraciones sustanciales en el ARNm. Como se muestra en la figura 38 existen dos regiones con una elevada probabilidad de apareamiento. La primera región correspondería a la zona de oclusión de la posible RBS de *cbrA* con la secuencia codificante de *cbrX* (GGUCCUGCUUC) mientras que la segunda región a una horquilla generada dentro de la secuencia de *cbrX* (Figura 38). No obstante, ni la probabilidad de apareamiento de cada nucleótido es relevante ni la estructura general del ARNm se ven alteradas significativamente con ninguna de las mutaciones puntuales en la secuencia de *cbrX*.



**Figura 38. Predicción de estructura secundaria del ARNm de los diferentes mutantes en *cbrX*.** Los colores indican la frecuencia en escala de 0 a 1 de que los nucleótidos se encuentren en la forma, apareada o libre, indicada en cada estructura. Los codones de inicio de la traducción se indican mediante flechas, negra: ATG de *cbrA*, azul: ATG1 de *cbrX*, rosa: ATG2 de *cbrX*. Las posibles Shine-Dalgarno de *cbrX* y *cbrA* se representan rodeadas en azul.

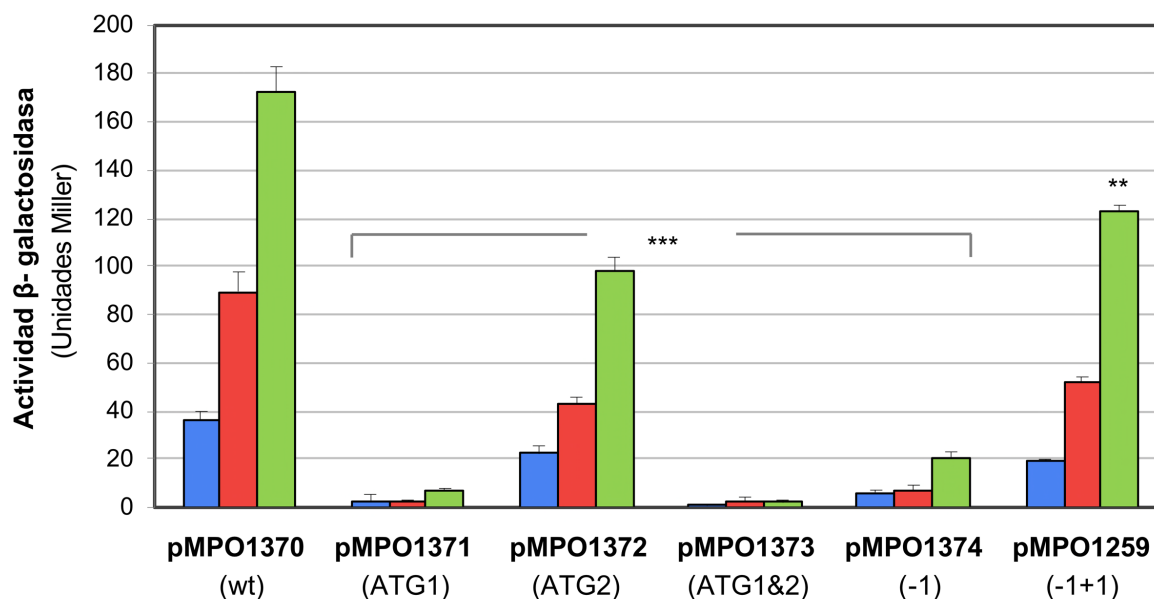


#### 4.1.3.3.1. Efecto de *cbrX* sobre la traducción de *cbrA*

Para estudiar el efecto de *cbrX* y las versiones mutadas sobre la traducción de *cbrA*, se cuantificó la cantidad de CbrA producida mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones traduccionales *cbrA*'-'*lacZ*. Para ello se clonó la versión silvestre o las versiones anteriores que tenían mutaciones puntuales en *cbrX* en el vector pMPO200 (apartado 3.4.2. de materiales y métodos). Los plásmidos que contenían las fusiones traduccionales a *lacZ* fueron los siguientes: pMPO1370 (wt), pMPO1371 (ATG1), pMPO1372 (ATG2), pMPO1373 (ATG1&2), pMPO1374 (-1) y pMPO1259 (-1+1) (véase figura 37).

Cada uno de los plásmidos generados se transfirieron mediante conjugación a *P. putida* KT2442 y se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de represión catabólica (LB) y en limitación de carbono (Scc y OAA) (Figura 39). Como se puede observar, la cantidad de CbrA producida en la estirpe silvestre variaba en función del medio, siendo 2.5 y 4.8 veces superior en succinato y oxalacetato con respecto a la condición de LB (plásmido pMPO1370, que contenía la fusión con la secuencia silvestre). Esta es la primera vez que se describe que los niveles de la histidina quinasa se encuentren regulados por la fuente de carbono.

Por otro lado, la mutación del ATG1 de *cbrX* (plásmido pMPO1371), condición en la que no se produce CbrX (Figura 37), provocaba una disminución drástica hasta niveles basales de la traducción de *cbrA*. La mutación del segundo codón (ATG2), ubicado 60 pb aguas abajo del primero (plásmido pMPO1372), dio como resultado la disminución de la expresión de CbrA de 1.6 veces en LB, 2.1 veces en Scc y 1.7 veces en OAA (Figura 39). Como era de esperar, la mutación en ambos ATGs (plásmido pMPO1373) dio lugar a niveles de CbrA equivalentes a los obtenidos por la mutación del primer codón ATG correspondientes a los niveles basales de la fusión vacía (datos no mostrados). Aunque la reducción en los niveles de expresión de CbrA con la sustitución del ATG2, podría sugerir que el segundo codón de *cbrX* pudiera ser empleado como codón alternativo de inicio de la traducción pero con menos eficiencia, el hecho de que la mutación en el primer codón redujera los niveles de expresión a valores equivalentes al plásmido vacío pMPO200 (Figura 42), indicaría que el segundo codón no se puede usar como codón de inicio en el mutante ATG1. Por tanto, el efecto de la mutación ATG2 es probablemente una consecuencia de la alteración de la secuencia de aminoácidos de CbrX y no al uso de un codón alternativo de inicio. Esto demuestra que el ATG1 es el auténtico codón de inicio para la traducción de *cbrX*.



**Figura 39. Efecto de las mutaciones puntuales de *cbrX* en la expresión de *CbrA*.** Cuantificación de la expresión de *cbrA* medida como actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones traduccionales de *cbrA* a *lacZ* que contienen la secuencia silvestre (pMPO1370) o las mutaciones puntuales en la secuencia de *cbrX* en pMPO1371, pMPO1372, pMPO1373, pMPO1374 y pMPO1259. Se monitorizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *P. putida* KT2442 en LB (azul) y en medio M9 suplementado con succinato (rojo) u oxalacetato (verde). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-valores obtenidos tras aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.005$ .

La alteración de la pauta abierta de lectura de *cbrX* mediante la delección de una T después del primer codón de iniciación (plásmido pMPO1374) da lugar a la terminación prematura de la traducción y además la producción de un péptido truncado con una secuencia diferente (Figura 37). Los niveles de *cbrA* generados en estas condiciones fueron reducidos 5.8, 12.9 y 8.3 veces en LB, Scc y OAA, respectivamente, respecto al plásmido con la secuencia silvestre (pMPO1370). Por otro lado, al introducir una mutación compensatoria de la pauta de lectura inicial (inserción de una C en la posición +118) (plásmido pMPO1259), que generaba un péptido con la misma longitud que *CbrX* pero cuya secuencia en el extremo N-terminal era diferente a la silvestre, mostró una recuperación en la producción de *CbrA* a niveles considerables (50, 60 y 70 % de la actividad del silvestre en LB, Scc y OAA, respectivamente) (Figura 39).

Todos estos resultados indican la existencia de un acoplamiento traduccional donde la traducción completa de la pauta de lectura de *cbrX* es necesaria para la traducción de *cbrA*. A su vez, la alteración de la secuencia de *CbrX* en la construcción (-1+1) produce un péptido

con una estructura secundaria diferente que no corresponde a una  $\alpha$ -hélice cuando se usan algoritmos de predicción de estructura secundaria, por lo que es altamente improbable que la función de CbrX esté relacionada con su identidad como péptido, o su inserción en la membrana, aunque las diferentes secuencias de aminoácidos pudieran alterar levemente la capacidad de traducción completa de la pauta de lectura de *cbrX*.

#### 4.1.3.3.2. Efecto de *cbrX* sobre la transcripción de *cbrA*

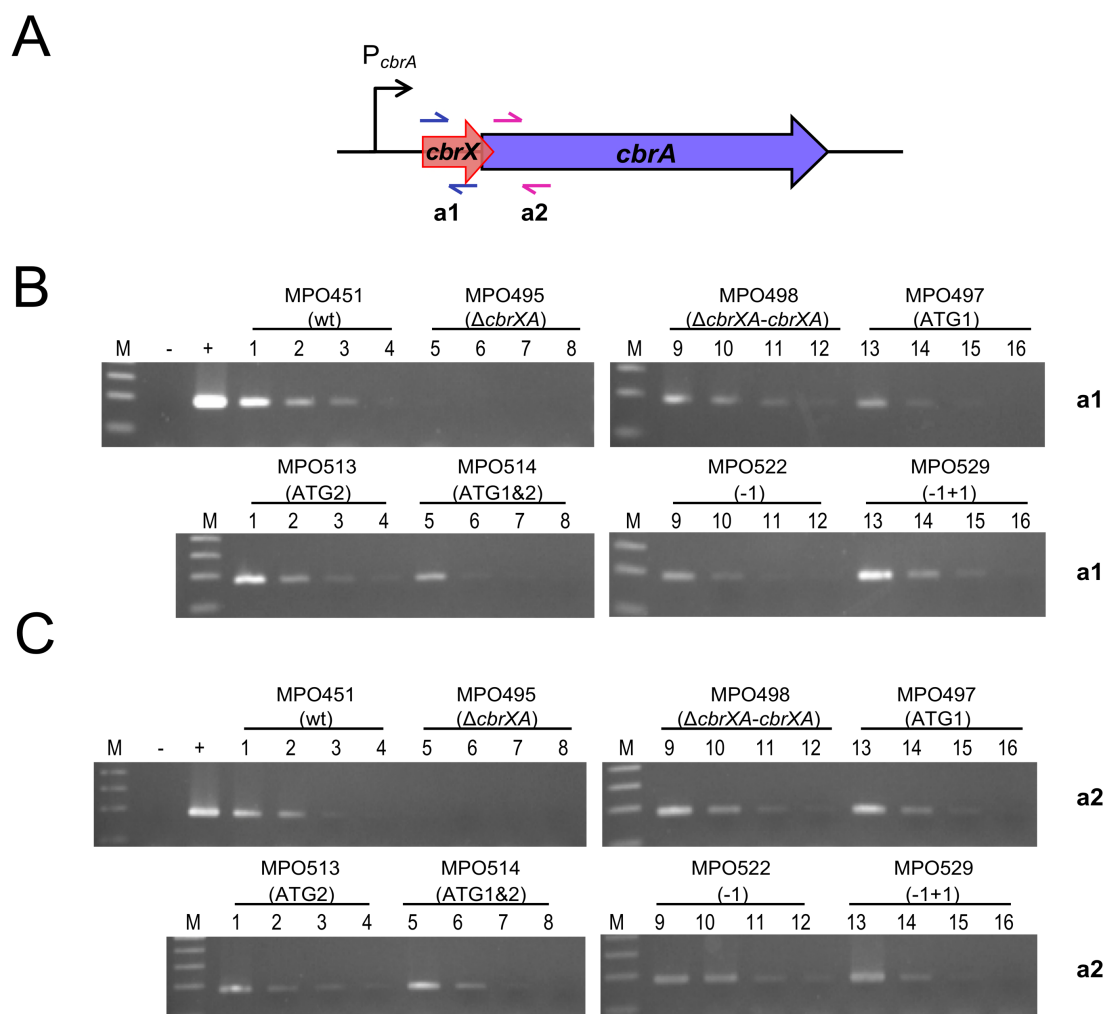
A tenor de los resultados obtenidos en el apartado anterior y para determinar si el efecto de las mutaciones en *cbrX* en la expresión de CbrA era consecuencia de la alteración en los niveles transcripcionales de *cbrA*, se midieron los niveles de ARNm mediante RT-PCR amplificando parte de las regiones codificantes de *cbrX* y *cbrA*. Además de la estirpe silvestre, se cuantificaron los niveles en estirpes mutantes que contenían las distintas versiones de *cbrX* descritas en el apartado 4.1.3.3.

El diseño experimental seguido para la construcción de los mutantes puntuales de *cbrX* se basó en la clonación de la secuencia *cbrX-cbrA* silvestre y aquellas secuencias portadoras de las anteriores mutaciones puntuales en *cbrX*, en el plásmido pME6182 destinado a integraciones en el sitio de Tn7 (apartado 3.3.2. de materiales y métodos). El mutante de delección  $\Delta cbrXA$  fue transformado por electroporación con los plásmidos pMPO1317 (silvestre), pMPO434 (ATG1), pMPO1344 (ATG2), pMPO1349 (ATG1&2), pMPO1368 (-1) y pMPO1369 (-1+1) dando lugar a las estirpes MPO498, MPO497, MPO513, MPO514, MPO522 y MPO529, respectivamente (véase figura 37). Como controles se llevaron la estirpe silvestre (MPO451) y mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO495) con el vector vacío pME6182 integrado en su genoma.

A continuación, se cuantificaron los niveles de ARNm de las distintas estirpes en las condiciones de máxima inducción del sistema Cbr (medio mínimo con oxalacetato), mediante RT-PCR empleando oligonucleótidos que hibridaban en las regiones codificantes de *cbrX* (a1) y *cbrA* (a2). El amplicón a1 (*cbrX*) contenía 177 pb y se amplificó con los oligonucleótidos RT-*cbrX\_fwd* / RT-*cbrX\_rev*, mientras que el amplicón a2 (*cbrA*) era del mismo tamaño y se amplificó con los oligonucleótidos RT-*CbrA\_fwd* / RT-*CbrA\_rev* (Figura 40 A).

El análisis de la transcripción mediante RT-PCR semi-cuantitativa con diferentes diluciones de ADNc revelaron que los niveles relativos de ARNm de ambos genes eran similares tanto en la estirpe silvestre (MPO451) como en el resto de mutantes que contenían las mutaciones puntuales en *cbrX* (Figura 40 B y C). Además, la ausencia de amplicón en el fondo mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO495) junto a los datos de RT-qPCR representados en el apartado

4.1.3.1. (Figura 31), volvió a confirmar la ausencia de expresión de *cbrX* y *cbrA* tras su delección del genoma de *P. putida*.



**Figura 40. Análisis por RT-PCR de la unidad transcripcional *cbrX-cbrA*.** (A) Diagrama que muestra el contexto genómico de *cbrX-cbrA* y los amplicones generados por RT-PCR con oligonucleótidos que hibridan en *cbrX* y *cbrA*. (B) Amplificación de un fragmento de ADN de *cbrX* de 177 pb se obtuvo por RT-PCR usando las parejas de oligonucleótidos RT-*cbrX*\_fwd / RT-*cbrX*\_rev hibridando en la región codificante de *cbrX* (coordenadas -160 hasta +17 desde el ATG de *cbrA*) (a1, flechas azules). (C) Amplificación de un fragmento de *cbrA* de 176 pb con los oligonucleótidos RT-*CbrA*\_fwd / RT-*CbrA*\_rev dentro de *cbrA* (coordenadas +48 hasta +224 desde ATG de *cbrA*) (a2, flechas rosas). El ADNc se obtuvo a partir de las estirpes MPO451 (silvestre), MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ), MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ ) MPO497 ( $\Delta cbrXA$ -ATG1), MPO513 ( $\Delta cbrXA$ -ATG2), MPO514 ( $\Delta cbrXA$ -ATG1&2), MPO522 ( $\Delta cbrXA$ -(-1)) y MPO529 ( $\Delta cbrXA$ -(-1+1)) cultivadas en medio mínimo con oxalacetato como fuente de carbono. La cantidad de ADNc en nanogramos utilizada como molde en la PCR fue de 25 ng (carriles 1,5, 9 y 13), 5 ng (carriles 2, 6, 10 y 14), 1 ng (carriles 3, 7, 11 y 15) y 0.5 ng (carriles 4, 8, 12 y 16). Como control negativo (-) no se empleó ADN y como control positivo (+) se utilizó 50 ng de ADN genómico de *Pseudomonas putida* KT2442.

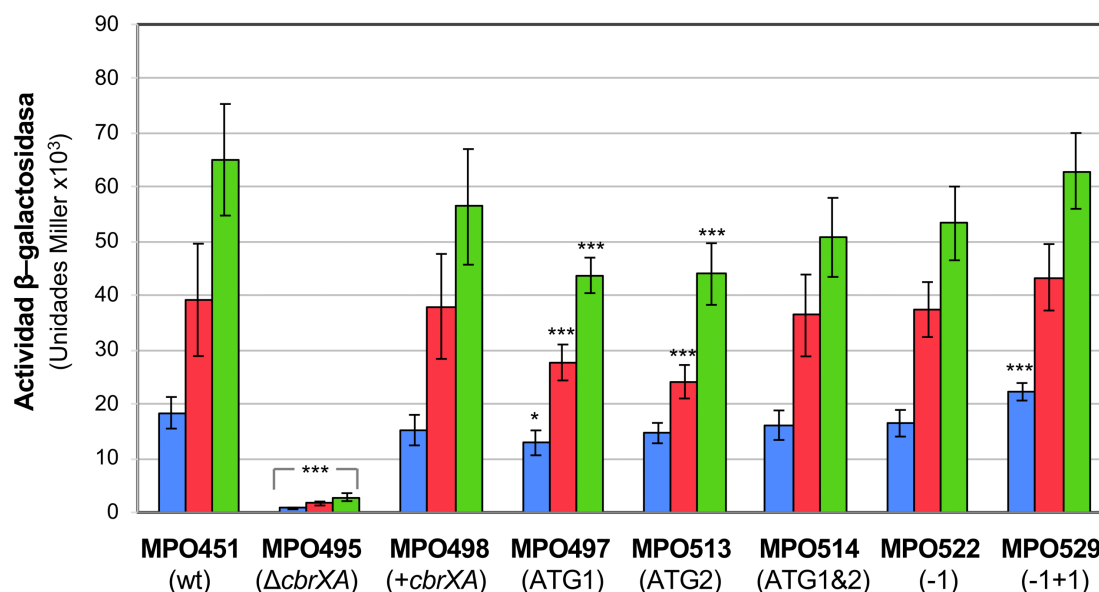
#### 4.1.3.3.3. Efecto de *cbrX* sobre la actividad de *cbrA*

Tras confirmar la existencia de un acoplamiento traduccional entre *cbrX* y *cbrA*, se procedió a evaluar el efecto de cada una de las mutaciones de *cbrX* en la capacidad de activación del sistema Cbr analizando la regulación de los niveles de *crcZ* mediado por CbrB. Para ello, todas las estirpes utilizadas previamente fueron transformadas con el plásmido pMPO1316 que contenía una fusión transcripcional de la región promotora de *crcZ* al gen *lacZ* y se monitorizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en LB, succinato y oxalacetato. Asimismo, se llevó como control la estirpe MPO451 derivada de la silvestre KT2442 con el plásmido vacío pME6182 insertado en el sitio T7.

La cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en el organismo silvestre MPO451 reveló una inducción diferencial de *crcZ*, indicando de nuevo que su regulación está sujeta a disponibilidad de carbono (Figuras 34 y 35). Los niveles de expresión fueron 2.1 y 3.5 veces superior en Scc y OAA, respectivamente, en comparación con el medio LB (Figura 41).

No obstante, en el fondo mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO495) alcanzó niveles basales en todos los medios demostrando una vez más que la expresión del promotor de *crcZ* es totalmente dependiente del sistema Cbr al igual que se observó con los ensayos de fluorimetría (Figuras 33 y 34). La complementación del mutante  $\Delta cbrXA$  con la copia silvestre (MPO498) restauró los niveles de transcripción de *crcZ* a niveles equivalentes al organismo silvestre (MPO451) tal y como se esperaba (Figura 41).

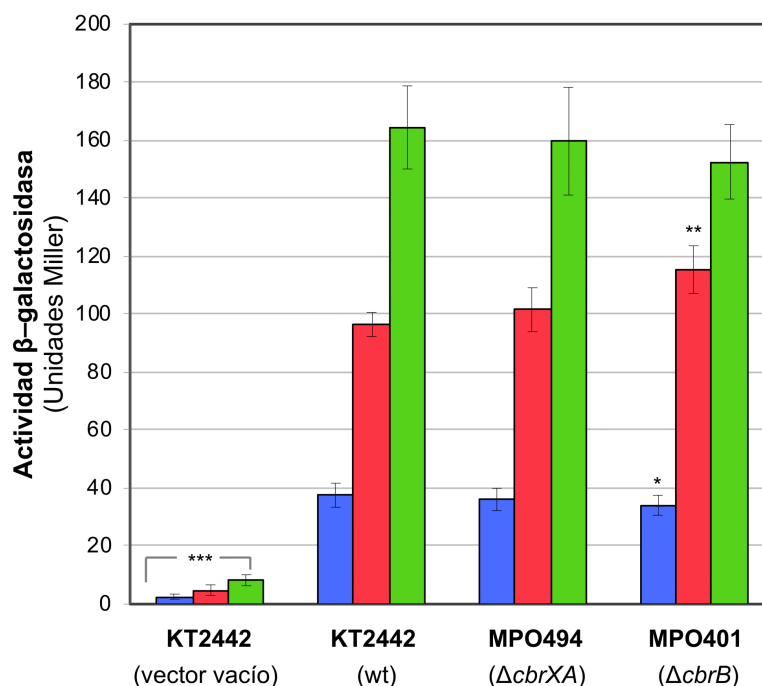
Sorprendentemente, y a pesar de que los niveles de CbrA producidos con las mutaciones en *cbrX* eran muy inferiores a los generados en el fondo silvestre, según indicaron las fusiones traduccionales a *lacZ* (Figura 39), la activación de *crcZ* resultó ser casi tan eficiente en los mutantes MPO497, MPO513, MPO514, MPO522 y MPO529 en todas las condiciones ensayadas como cuando la cantidad de CbrA era elevada.



**Figura 41. Medida de la expresión *in vivo* de *crcZ* en *P. putida* KT2442 y en mutantes con variantes de CbrX.** Expresión medida como actividad  $\beta$ -galactosidasa del plásmido pMPO1316 conteniendo la fusión transcripcional de *crcZ* al *lacZ* en las estirpes MPO451 (silvestre), MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ), MPO498 ( $\Delta cbrXA$ - $cbrXA$ ) MPO497 ( $\Delta cbrXA$ -ATG1), MPO513 ( $\Delta cbrXA$ -ATG2), MPO514 ( $\Delta cbrXA$ -ATG1&2), MPO522 ( $\Delta cbrXA$ -(-1)) y MPO529 ( $\Delta cbrXA$ -(-1+1)). Se monitorizó la actividad en medio LB (barras azules) y medio mínimo suplementado con succinato (barras rojas) u oxalacetato (barras verdes). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-values obtenidos tras aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

#### 4.1.4. Regulación de la expresión de CbrA y CbrB

En apartados anteriores se ha demostrado que CbrX desempeña una función esencial en la expresión de CbrA de modo que la expresión de un gen implica necesariamente la expresión del otro. Sin embargo, aún se desconoce si CbrA ejerce un papel regulador sobre su propio gen o, por el contrario, en dicha expresión intervienen otros elementos como su regulador de respuesta afín, CbrB. Entonces, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión traduccional de *cbrA*'-'*lacZ* contenida en el plásmido pMPO1370 en los fondos genéticos silvestre (KT2442) y mutantes de delección  $\Delta cbrXA$  y  $\Delta cbrB$  en los tres medios que representan una graduación del fenómeno de represión catabólica (LB, Scc y OAA) (Figura 42).



**Figura 42. Medida de la expresión *in vivo* de CbrA en *P. putida* KT2442 y en los fondos mutantes  $\Delta cbrXA$  y  $\Delta cbrB$ .** Los niveles de expresión se estimaron como actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión traduccional de *cbrA*'-'*lacZ* en el plásmido pMPO1370 (coord.+249) para los fondos silvestre (KT2442) y mutantes  $\Delta cbrXA$  (MPO494) y  $\Delta cbrB$  (MPO401). Los ensayos se realizaron en medio rico LB (barras azules) y medio mínimo con succinato (barras rojas) y oxalacetato (barras verdes) como fuentes de carbono. Como control se usó el plásmido vacío pMPO200. Los valores corresponden a las medias y las barras de error indican las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-valores obtenido de aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

En el organismo silvestre, se observó de nuevo una inducción gradual de la expresión de CbrA en función del medio ensayado, siendo de 2.6 veces en Scc y 4.4 veces en OAA con respecto al medio LB. Estos resultados indican que la expresión de CbrA es dependiente de la disponibilidad de carbono en el medio siendo más elevada en presencia de fuentes pobres de carbono como es el OAA. Cuando se analizó la expresión de CbrA en un mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO494) se obtuvieron niveles de expresión equivalentes al organismo silvestre lo que descarta una autorregulación de su propio gen (Figura 42). El patrón de expresión también se conservó en un fondo  $\Delta cbrB$  (MPO401), indicando así que dichos niveles de expresión regulados también son independientes del regulador transcripcional CbrB o de su estado de fosforilación.

## Capítulo 2. Caracterización funcional de los dominios de CbrA

En el capítulo 1 se ha profundizado en algunos de los mecanismos de regulación de la expresión de CbrA, como la dependencia de la disponibilidad de carbono y la participación de elementos hasta entonces no descritos como CbrX. Además, se han descrito las condiciones de máxima inducción del sistema Cbr que permiten evaluar la actividad de CbrA en respuesta a una señal aún desconocida. Un paso previo a la búsqueda de la señal activadora del sistema Cbr, es la identificación del origen de la misma, mediante la caracterización de los diferentes dominios de CbrA.

De todas las histidina quinasas descritas en la bibliografía CbrA es una HK atípica, y su estructura modular sugiere que existe un acoplamiento del transporte de alguna molécula con su capacidad sensora (Sepulveda & Lupas, 2017). Estudios recientes sugieren que CbrA no solo detecta histidina sino que también es capaz de internalizarla en un proceso de transporte a través de los dominios TM que desencadenaría finalmente la activación del sistema Cbr (Zhang et al., 2015). La conservación de dominios en CbrA entre diferentes especies de *Pseudomonas* es bastante elevada, e incluye 13 dominios transmembrana en el extremo N-terminal y un dominio PAS que precede a los dominios de dimerización, fosfotransferencia y catalítico en su extremo C-terminal (véase introducción apartado 1.3.1.). En el presente capítulo, se estudiará la participación de cada uno de los dominios de la proteína sensora CbrA en la recepción de la señal, con el objeto de discernir la naturaleza y procedencia de la señal inductora del sistema Cbr.

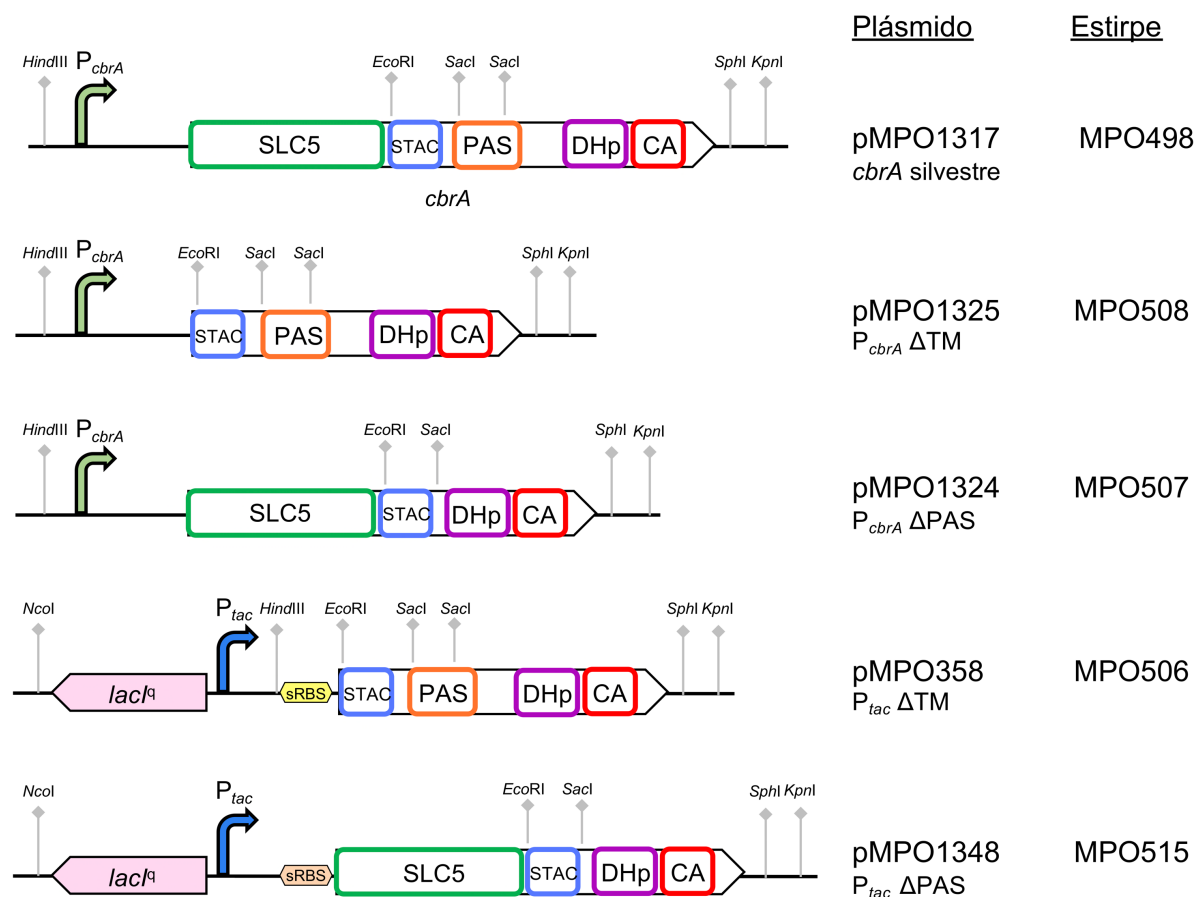
### 4.2.1. Caracterización fenotípica de los mutantes de delección de los dominios de CbrA

Para estudiar la implicación de los dominios de CbrA en la activación del sistema regulador Cbr, e intentar determinar el origen de la señal inductora, se diseñaron diferentes versiones de la proteína CbrA en las que se delecionó individualmente cada dominio. Cada una de las versiones truncadas se expresó a distinto nivel: bien desde su propio promotor ( $P_{cbrA}$ ), o bien, desde un casete de expresión  $lacI^q$ - $P_{tac}$  y una *Shine-Dalgarno* sintética optimizada, que garantizaba altos niveles de transcripción y de traducción. Ambas construcciones de cada versión de CbrA se utilizaron para complementar en el sitio Tn7 del cromosoma al mutante  $\Delta cbrXA$ .

En la figura 43, se recoge en forma de esquema las versiones truncadas de CbrA en sus respectivos plásmidos, cuya construcción se detalla en el apartado 3.4.3. de materiales y



métodos. En la columna de la derecha también se indican las estirpes resultantes de la inserción en el cromosoma del transposón miniTn7 conteniendo cada una de las construcciones indicadas.



**Figura 43. Esquema de las versiones de CbrA silvestre y mutantes en sus dominios PAS y TM.**

En la parte superior se representa mediante marcas verticales grises las dianas de restricción presentes en los dominios de CbrA silvestre en el plásmido pMPO1317. *P<sub>cbrA</sub>*: Región promotora de *cbrA*, SLC5: Dominios transmembrana del transportador de soluto de la familia 5, STAC: Dominio asociado a transportadores SLC5 de sistemas de transducción de señales, PAS: Dominio PAS, DHp: Dominio de dimerización y fosfotransferencia, CA: Dominio catalítico de unión a ATP, sRBS: Sitio sintético de unión al ribosoma. También, se muestra un esquema de las construcciones truncadas de CbrA:  $\Delta$ TM y  $\Delta$ PAS expresadas desde su propio promotor en los plásmidos pMPO1325 y pMPO1324, así como su superproducción bajo el promotor fuerte *P<sub>tac</sub>*, en los plásmidos pMPO358 y pMPO1348, respectivamente. En la columna de la izquierda se indica el nombre del plásmido empleado para generar cada una de las estirpes resultantes (columna derecha) tras su integración en el genoma del mutante  $\Delta$ *cbrXA*.

#### 4.2.1.1. Análisis estructural de las versiones de CbrA truncadas

Previamente al análisis funcional de las versiones de CbrA carente de los dominios TM y del dominio PAS, se llevó a cabo un análisis estructural por predicción de homología de secuencia, empleando la herramienta bioinformática InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Jones et al., 2014). InterPro utiliza modelos predictivos proporcionados por varias bases de datos que permiten clasificar las proteínas en familias y obtener información acerca de dominios estructurales y términos GO (ontología genética), así como los procesos biológicos en los que participa, su función molecular y su localización celular.

La secuencia traducida de CbrA silvestre de 991 aminoácidos se integró en la familia de transportadores Na<sup>+</sup>/soluto, que se caracteriza por contener de promedio de 11 a 15 dominios TM en conformación  $\alpha$ -hélice (IPR001734). El modelo de unión de este tipo de proteína sugiere que la unión del sodio provoca un cambio conformacional que aumenta la afinidad del transportador por un soluto específico. En concreto, CbrA presenta 13 dominios TM que son homólogos a una región transmembrana típica de transportadores Na<sup>+</sup>/glucosa (IPR038377; aa 10 a 493) que le permiten su anclaje en la membrana interna, un dominio STAC (aa 521 a 594), un dominio PAS (IPR035965; aa 623 a 718), un dominio de dimerización y fosfotransferencia (DHp) (IPR036097; aa 754 a 817) y un dominio catalítico de unión a ATP (CA) (IPR036890; aa 866 a 978) (véase introducción apartados 1.2.2.1. y 1.3.1.).

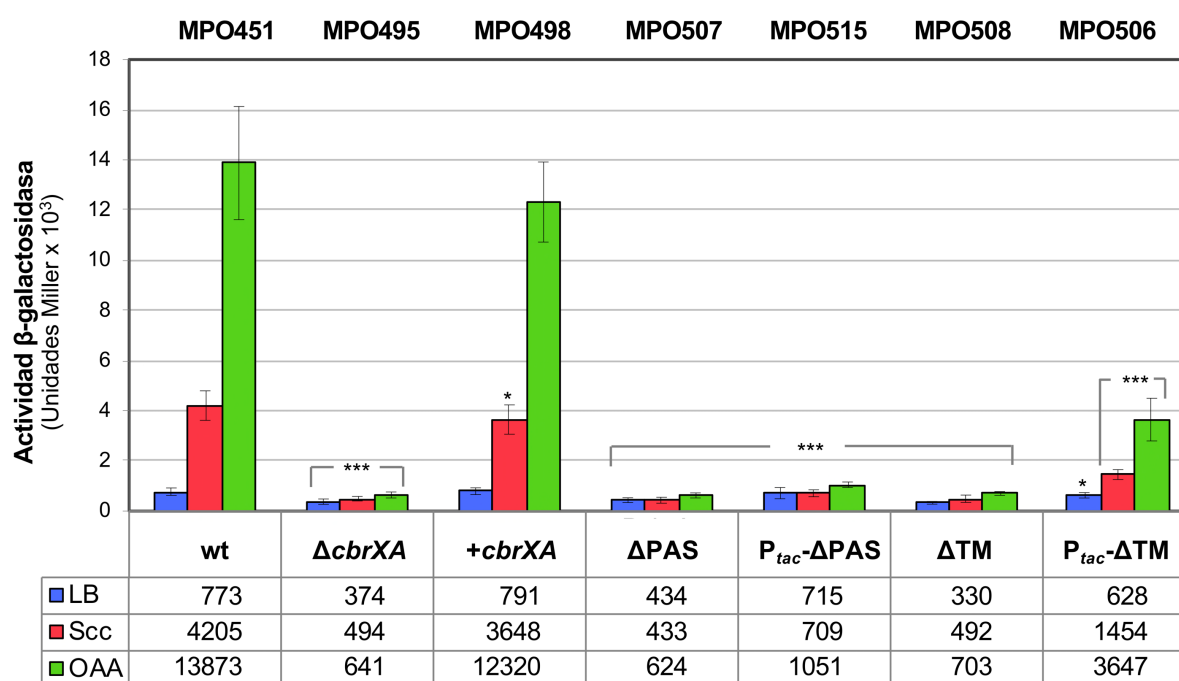
Las versiones truncadas de CbrA a las que se le delecionaron sus 13 dominios transmembrana (CbrA- $\Delta$ TM, plásmidos pMPO1325 y pMPO358, en bajo y alto número de copia), tienen una longitud de 466 aa. La versión CbrA- $\Delta$ TM no debe estar anclada a membrana, ya que se ha delecionado completamente la región TM predicha según InterPro, y este hecho fue corroborado por el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), que mostró que no poseía ningún dominio TM. El resto de los dominios que contiene la proteína CbrA- $\Delta$ TM (el dominio STAC (aa 1 a 69), el dominio PAS (aa 97 a 214), el dominio DHp (aa 231 a 294) y el dominio CA (aa 338 a 453)) permanecieron inalterados respecto al extremo Ct de la versión silvestre.

La delección del dominio PAS de la proteína nativa (CbrA- $\Delta$ PAS, plásmidos pMPO1324 y pMPO1348) generó un producto génico de 915 aa, que se debía localizar en la membrana interna, ya que sus dominios TM (aa 10 a 493) permanecían intactos respecto a la versión silvestre. Inmediatamente aguas abajo se sitúan los dominios STAC (aa 521 a 594), DHp (aa 680 a 743) y el dominio CA (aa 787 a 902).

#### 4.2.1.2. Análisis funcional de las versiones de CbrA truncadas

Una vez construidas las versiones truncadas de CbrA, se procedió a evaluar el grado de complementación del mutante de delección  $\Delta cbrXA$ , según su capacidad de activar al sistema Cbr. Como diana indicadora se empleó el gen *PP2810*, ya que es la que mejor discrimina entre distintas fuentes de carbono (véase apartado 4.1.3.2.2.) y permite detectar una inducción progresiva al detectar pequeñas diferencias en los niveles de expresión. Para ello, se ensayó la fusión transcripcional de la región promotora del gen *PP2810* a *lacZ* en el plásmido pMPO420.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *PP2810::lacZ* en las estirpes silvestre y mutantes de los dominios de CbrA en LB, succinato y OAA se muestra en la figura 44.



**Figura 44. Niveles de expresión de *PP2810* en las estirpes con las versiones truncadas de los dominios  $\Delta TM$  y  $\Delta PAS$  de CbrA.** Medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional *P<sub>PP2810</sub>::lacZ* (pMPO420) en las estirpes MPO451 (silvestre, wt), MPO495 ( $\Delta cbrXA$ ), MPO498 ( $\Delta cbrXA$ - $cbrXA$ ), MPO507 ( $\Delta PAS$ ), MPO515 ( $P_{tac}$   $\Delta PAS$ ), MPO508 ( $\Delta TM$ ) y MPO506 ( $P_{tac}$   $\Delta TM$ ). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-values obtenido tras aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

La inducción diferencial de PP2810 en función de la disponibilidad de carbono en el medio fue nuevamente evidente en el organismo silvestre MPO451, siendo de 5.4 y 18 veces mayor en Scc y OAA con respecto al medio rico LB. Además, la dependencia de la activación de PP2810 del sistema Cbr se observó con el descenso notable en los niveles de expresión en el fondo mutante MPO495 (Figura 44). Cuando se complementó al mutante  $\Delta cbrXA$  con la secuencia completa *cbrX-cbrA*, la estirpe generada, MPO498, manifestó un fenotipo de expresión de PP2810 equivalente al fondo silvestre, lo que confirmó la eficacia de la complementación tal y como se observó en ensayos previos (véase apartado 4.1.3.2.2.).

La estirpe que portaba la delección en fase del dominio PAS ( $\Delta PAS$ ), que generaba una proteína CbrA de 915 aminoácidos, no fue capaz de activar al gen diana PP2810 ni en condiciones fisiológicas (expresada desde su propio promotor; estirpe MPO507) ni tampoco cuando se sobreexpresó desde  $P_{tac}$  (estirpe MPO515), en ninguno de los tres medios ensayados. En todos los casos los niveles de expresión fueron similares a los obtenidos por el mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO495). La proteína carente del dominio PAS conservaba intactos sus dominios transmembrana por lo que es muy probable que se mantuviera anclada a la membrana interna tal y como se presume para CbrA silvestre.

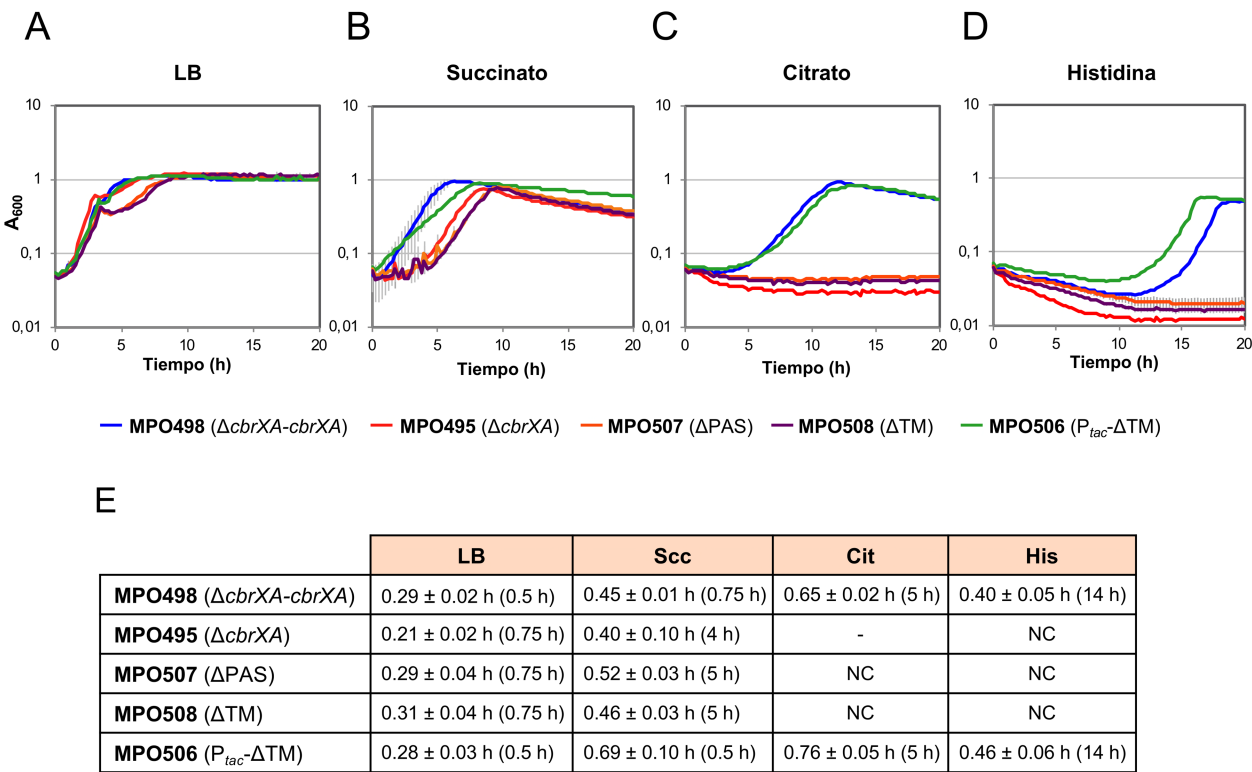
Cuando se analizó la activación de PP2810 por la versión de CbrA en la que se habían eliminado los 13 dominios TM ( $\Delta TM$ ) y se expresaba desde su promotor (niveles fisiológicos; estirpe MPO508), no se observó actividad en ninguna condición de disponibilidad de carbono. Sin embargo, cuando esta misma versión de CbrA se sobreexpresó mejorando su transcripción y traducción (estirpe MPO506), se detectó una activación en OAA de 5.8 y 2.5 veces en comparación con LB y succinato, respectivamente. Si bien la actividad alcanzó un 40 % (en Scc) y un 30 % (en OAA) de la actividad de la estirpe complementada con la versión silvestre MPO498, estos datos indican que el dominio catalítico de esta versión truncada de CbrA es capaz de fosforilar CbrB por sí solo en estas condiciones, obteniendo así una inducción parcial del sistema (Figura 44). Los dominios TM con homología a un transportador de soluto, por tanto, no parecen ser esenciales para la transducción de la señal activadora.

#### **4.2.1.3. Utilización de distintas fuentes de carbono por las versiones de CbrA truncadas**

Se estudió además la posible implicación de los dominios de CbrA en la asimilación de distintas fuentes de carbono en los diferentes mutantes. Para ello se monitorizó el crecimiento a lo largo del tiempo de la estirpe complementada con la versión silvestre (MPO498), con los mutantes de delección  $\Delta cbrXA$  (MPO495),  $\Delta PAS$  (MPO507),  $\Delta TM$  (MPO508) y con el mutante

que sobreexpresa la versión  $\Delta TM$  de CbrA (MPO515). La estirpe MPO498 se seleccionó como control de referencia al manifestar el fenotipo equivalente al organismo silvestre *P. putida* KT2442 tras la complementación del mutante de delección.

En la figura 45 se muestran las cinéticas de crecimiento en medio LB y medio mínimo suplementado con succinato, citrato e histidina como fuentes de carbono, para las distintas variantes de CbrA.

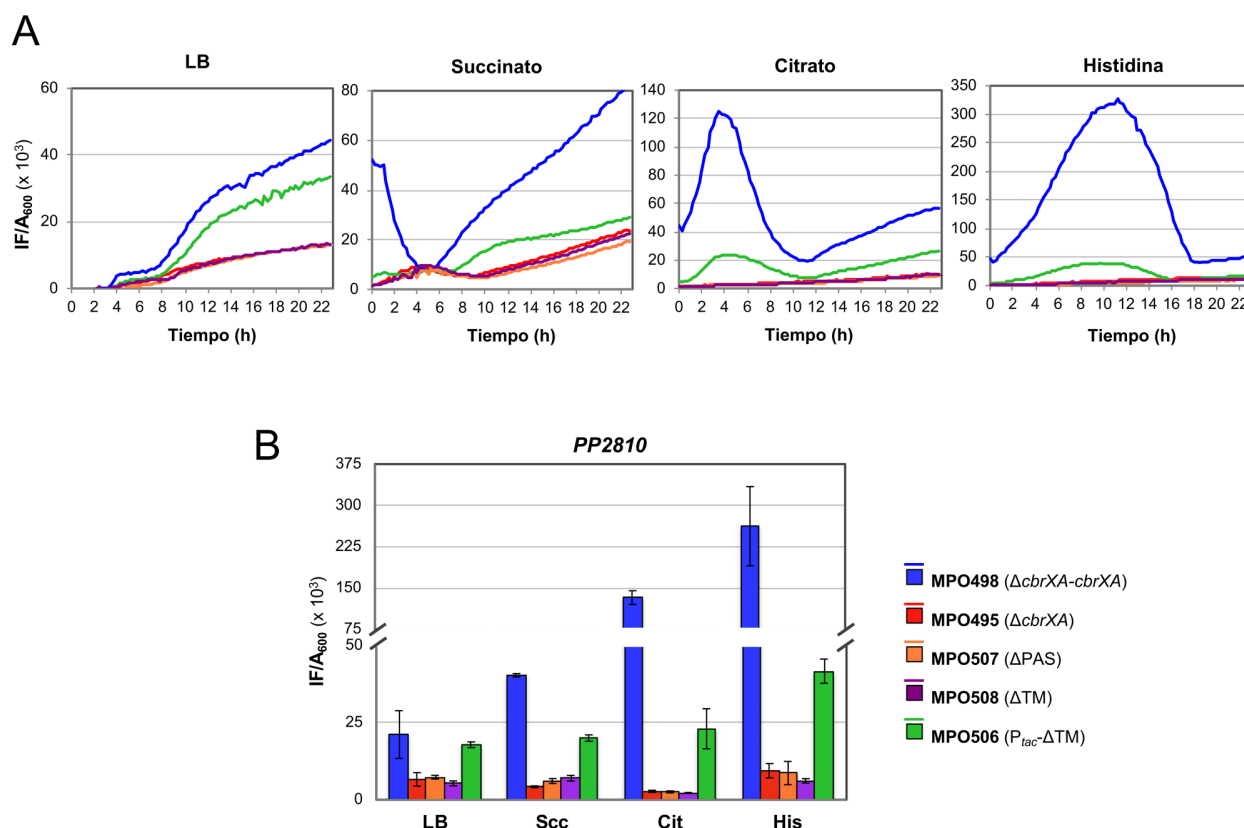


**Figura 45. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y los mutantes  $\Delta cbrXA$ ,  $\Delta PAS$ ,  $\Delta TM$  y  $P_{tac}$ - $\Delta TM$  en diferentes fuentes de carbono.** Curvas de crecimiento del mutante de delección  $\Delta cbrXA$  (MPO495, rojo) y variantes de la misma estirpe complementada con la versión *cbrXA* silvestre (MPO498, azul), con versiones truncadas de la proteína CbrA en los dominios  $\Delta PAS$  (MPO507, naranja),  $\Delta TM$  (MPO508, morado) o con la versión que sobreexpresa la versión soluble de CbrA,  $P_{tac}$ - $\Delta TM$  (MPO506, verde) en medio LB (A) y medio mínimo suplementado con succinato (B), citrato (C) e histidina (D) como fuentes de carbono. Las gráficas corresponden a un experimento representativo de tres réplicas biológicas y las barras de error a la desviación estándar de tres réplicas técnicas. (E) Tiempo de generación y fase de latencia de las estirpes MPO498, MPO495, MPO507, MPO508 y MPO506 en medio rico (LB), y medio mínimo M9 con succinato (Scc), citrato (Cit) e histidina (His) como fuentes de carbono. La fase de latencia en cada condición ensayada se indica entre paréntesis, ausencia de crecimiento como NC y crecimiento después de 20 h como -. El tiempo de generación se estimó durante la fase exponencial de crecimiento como una extrapolación de la ecuación exponencial.

Todas las estirpes crecieron eficientemente en medio LB a pesar de la delección de los dominios TM o PAS de CbrA (Figura 45 A y E). En lo referido al crecimiento en medio mínimo con succinato, los mutantes  $\Delta cbrXA$  (MPO495),  $\Delta PAS$  (MPO507) y  $\Delta TM$  (MPO508) reflejaron una respuesta adaptativa considerablemente menor que el organismo complementado con la versión silvestre (MPO498) mostrando una fase de latencia entre 3 h y 4 h más larga aproximadamente (Figura 45 B y E). La sobreexpresión de la versión CbrA- $\Delta TM$  (estirpe MPO506), permitió recuperar la capacidad de asimilar succinato de manera equivalente a la estirpe complementada alcanzando la fase exponencial de crecimiento a las 0.5 h (Figura 45 B y E).

Por otra parte, el crecimiento de la estirpe mutante  $\Delta cbrXA$  (MPO495) y aquellas que carecen de los dominios PAS (MPO507) y TM (MPO508) se vio drásticamente afectado en citrato o histidina (Figura 45 C y D). Sin embargo, al sobreexpresar el extremo C-terminal que contiene el dominio PAS junto a los dominios de dimerización (DHp) y catalítico (CA) (estirpe MPO506), se logró restablecer la capacidad de utilizar histidina o citrato de manera tan eficiente como la estirpe complementada con la versión silvestre, teniendo una fase de latencia de 5 h en citrato y 14 h en histidina (Figura 45 C, D y E). Estos resultados demuestran que los dominios transmembrana son prescindibles para el transporte y/o la asimilación de histidina y citrato como fuentes de carbono y energía.

Para comprobar si el sistema en estas condiciones de sobreexpresión, además de permitir la utilización de histidina y citrato, se encontraba activo en su capacidad de activar a CbrB, se analizaron los niveles de expresión de *PP2810* a lo largo del tiempo. Entonces, se cuantificó la fluorescencia específica de las respectivas estirpes conteniendo una fusión transcripcional de *PP2810* a *gfpmut3::lacZ* (plásmido pMPO355) en las mismas condiciones experimentales (Figura 46).



**Figura 46. Análisis de la expresión de *PP2810* en la estirpe mutante complementada con la versión *CbrA* silvestre o las versiones de *CbrA* truncadas en diferentes fuentes de carbono.** Los niveles de expresión se representan como intensidad de fluorescencia (IF) emitida por *gfp* normalizada por la densidad óptica  $A_{600}$  para las estirpes MPO498 ( $\Delta cbrXA-cbrXA$ , azul), MPO495 ( $\Delta cbrXA$ , rojo), MPO507 ( $\Delta PAS$ , naranja), MPO508 ( $\Delta TM$ , morado) y MPO506 ( $P_{tac}-\Delta TM$ , verde) conteniendo la fusión transcripcional de *PP2810* a *gfpmut3::lacZ* en el plásmido pMPO355. **(A)** Se monitorizó los niveles de expresión durante 23 h en cultivos crecidos en LB y medio mínimo con succinato (Scc), citrato (Cit) e histidina (His). Las gráficas corresponden a un experimento representativo de al menos tres réplicas biológicas y las barras de error a la desviación estándar de tres réplicas técnicas. **(B)** Las gráficas representan las diferencias más evidentes en los niveles de expresión de *PP2810* en LB y medio mínimo con succinato (Scc), citrato (Cit) e histidina (His) como fuentes de carbono. Las barras corresponden a la media y a la desviación estándar de al menos tres réplicas biológicas y nueve réplicas técnicas.

Los resultados de expresión de *PP2810* mostraron una correlación inversa con el crecimiento, como se había observado previamente (aunque de forma más sutil) para *crcZ* y *crcY* (Figura 32 y 33). Al igual que en experimentos anteriores (Figura 33 C y 34 C), los niveles de fluorescencia reflejaron una inducción diferencial de *PP2810* según la disponibilidad de carbono en la estirpe complementada, MPO498, alcanzando niveles progresivamente más altos en Scc, Cit e His (Figura 46). No se observaron diferencias significativas en los mutantes

$\Delta cbrXA$  (estirpe MPO495),  $\Delta TM$  (estirpe MPO508) y  $\Delta PAS$  (estirpe MPO507) los cuales reprodujeron el mismo patrón de expresión para *PP2810* con unos valores próximos al nivel basal, indicando la relevancia de estos dominios en la función de CbrA. No obstante, la estirpe MPO506 que superproduce la versión CbrA- $\Delta TM$ , mostró inducción de la expresión de *PP2810*, aunque los niveles de expresión son sensiblemente más bajos que los de la versión silvestre. El porcentaje de recuperación de la actividad de CbrA- $\Delta TM$  en el fondo MPO506 fue del 84 % en LB, 50 % en succinato, 17 % en citrato y 16 % en histidina (Figura 46 B). Es interesante observar que esta estirpe mostró una cinética de inducción muy similar a la observada con la versión silvestre de CbrA, con una activación transitoria y gradual durante las condiciones de limitación de carbono en MM con Cit y MM con His, durante la fase lag, seguida de una reducción de su expresión durante el crecimiento exponencial, pudiéndose recuperar esta expresión en mayor o menor medida en los distintos medios al llegar a la fase estacionaria (Figura 46 A). A su vez, se observó que los niveles máximos de expresión obtenidos en los distintos medios correlacionan con la capacidad de crecimiento en estos medios. Estos valores fueron a su vez coherentes con la caracterización previa de la inducción de *PP2810* medida como actividad  $\beta$ -galactosidasa en la fase exponencial en la estirpe CbrA- $\Delta TM$  sobreexpresada en comparación con la estirpe portadora de la versión CbrA- $\Delta TM$  expresada desde su promotor nativo (Figura 44). Además, permite ratificar que la recuperación de la capacidad de asimilar histidina de CbrA- $\Delta TM$  se correlaciona con la activación del sistema Cbr mediante la recuperación de los niveles de activación transcripcional de *PP2810* tal y como se aprecia en la figura 46.

Aunque parcial, la actividad de CbrA- $\Delta TM$ , capaz de discriminar entre los distintos medios de cultivo de forma similar a CbrA silvestre, indica que los dominios transmembrana son prescindibles para realizar su función activadora y su respuesta a la señal reguladora. Por otra parte, la importancia del dominio PAS en la funcionalidad de *cbrA* lo convierte, por tanto, en el dominio candidato para la recepción de la señal activadora del sistema.

## 4.2.2. Localización intracelular de las proteínas de CbrA

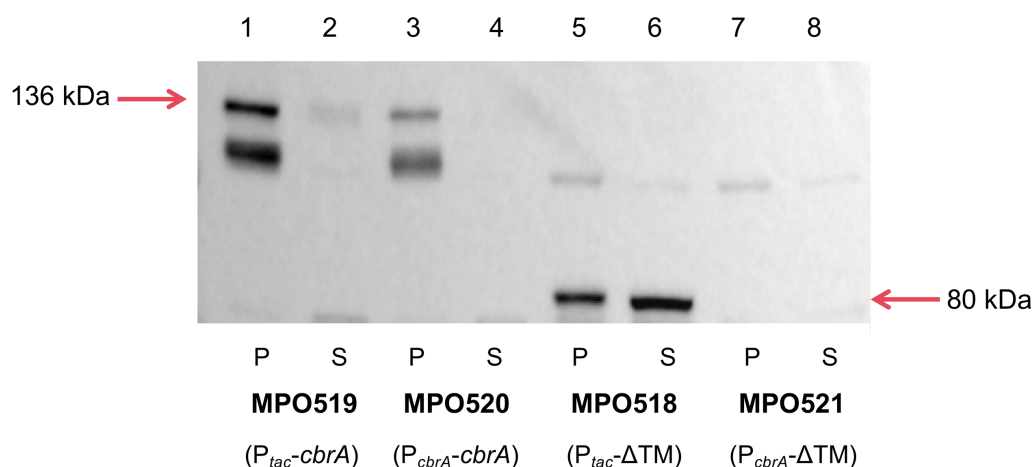
### 4.2.2.1. Análisis por *Western blotting*

En la caracterización funcional de los dominios de CbrA se detectó una activación sustancial del sistema Cbr mediada por la versión de la proteína troncada en sus dominios transmembrana (CbrA- $\Delta TM$ ) cuando se encontraba en dosis altas (expresada bajo  $P_{tac}$ ) (Figura 44, MPO506 respecto a MPO498). Para estimar la cantidad de CbrA silvestre y de su variante CbrA- $\Delta TM$  producidas y detectar su localización subcelular se construyeron proteínas



de fusión a *gfp* en sus respectivos extremos Ct en el vector pMPO1350 (apartado 3.4.4. de materiales y métodos). De este modo se generaron los plásmidos pMPO1261 y pMPO1367, que contenían las fusiones de CbrA y CbrA-ΔTM expresadas bajo su propio promotor, y los plásmidos pMPO1359 y pMPO1358, que contenían las mismas variantes sobreexpresadas desde el promotor fuerte  $P_{tac}$  y una *Shine-Dalgarno* sintética optimizada. Cada uno de los plásmidos se integraron en el sitio Tn7 del cromosoma del mutante Δ*cbrXA* (MPO494) dando lugar a las estirpes MPO520, MPO521, MPO519 y MPO518, respectivamente. Las células fueron inducidas en medio mínimo con succinato hasta alcanzar la fase exponencial media ( $A_{600} = 0.3$ ), momento en el cual se separaron las fracciones soluble y de membrana (véase apartado 3.6.1. de materiales y métodos).

La detección de las proteínas con un anticuerpo anti-GFP reveló la presencia de dos péptidos de tamaño correspondiente a CbrA'-GFP (136 kDa) y a CbrA-ΔTM'-GFP (80 kDa). Como se aprecia en la figura 47, la proteína completa CbrA'-GFP expresada desde su propio promotor, se detectó mayoritariamente en la fracción de membrana (Figura 47, carril 3). La superproducción de esta proteína mediante el uso del promotor fuerte  $P_{tac}$  dio lugar a una mayor producción de CbrA'-GFP, que también se asoció a la fracción de membrana (Figura 47, carril 1).



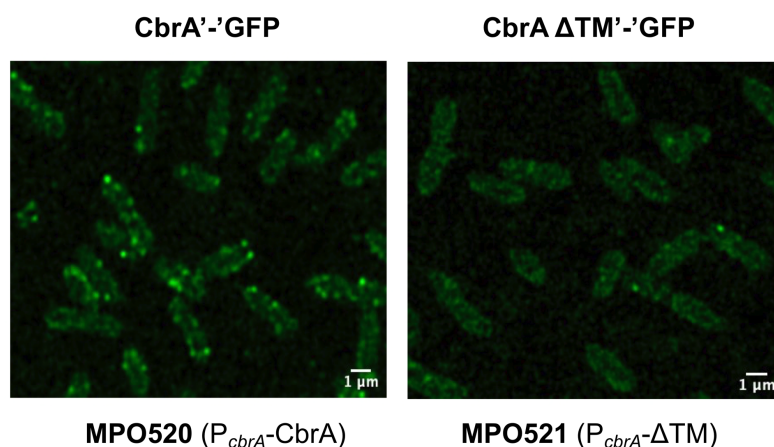
**Figura 47. Detección de la proteína CbrA y la versión truncada CbrA-ΔTM fusionadas a GFP mediante *Western blotting*.** Ensayo de *Western blotting* de las fracciones soluble (S) y de membrana (P) de las estirpes MPO519 ( $P_{tac}$ -CbrA), MPO520 ( $P_{cbrA}$ -CbrA), MPO518 ( $P_{tac}$ -ΔTM) y MPO521 ( $P_{cbrA}$ -ΔTM) cultivadas en medio mínimo con succinato como fuente de carbono. Se cargaron 10 μg de proteína total de las fracciones de membrana (carriles 1, 3, 5 y 7) y solubles (carriles 2, 4, 6 y 8). Las fracciones de membrana fueron concentradas 10 veces para normalizar la cantidad total de proteína cargada en el gel. Las flechas rojas indican el tamaño correspondiente a las proteínas CbrA y CbrA-ΔTM fusionadas a GFP (136 y 80 kDa, respectivamente).

Por otro lado, la producción de la versión CbrA- $\Delta$ TM'-GFP expresada desde su promotor no fue fácilmente detectable en ninguna de las fracciones (Figura 47, carriles 7 y 8), aunque su producción se incrementó considerablemente cuando expresó desde  $P_{tac}$  (Figura 47, carriles 5 y 6). La proteína CbrA- $\Delta$ TM sobreexpresada bajo  $P_{tac}$  se acumula claramente en la fracción soluble (Figura 47, carril 6) en comparación con la CbrA completa en las mismas condiciones (Figura 47, carril 2). Dado que las fracciones de membrana se concentraron 10 veces en relación con las fracciones solubles para normalizar la cantidad total de proteína cargada en el *Western blotting*, se detectó una fracción sustancial de CbrA- $\Delta$ TM-GFP en la fracción insoluble (Figura 47, carril 5). Esto puede ser debido también a una posible rotura celular incompleta, a la agregación parcial de la proteína en cuerpos de inclusión o a restos realmente solubles pero que quedan atrapados en la fracción viscosa insoluble. En cualquier caso, la acumulación mayoritaria en la fracción soluble de la versión de CbrA que carecía de los 13 dominios transmembrana indicaba que se hallaba soluble en el citosol.

#### 4.2.2.2. Microscopía confocal de superresolución

Como complemento al estudio de localización celular de CbrA y CbrA- $\Delta$ TM por *Western blotting*, se visualizaron las estirpes mediante microscopía confocal. De este modo, se utilizaron las estirpes que contenían las versiones de CbrA'-GFP expresadas bajo su propio promotor, MPO520 ( $P_{cbrA}$ -CbrA) y MPO521 ( $P_{cbrA}$ -CbrA- $\Delta$ TM), o sobreexpresadas desde  $P_{tac}$ , MPO519 ( $P_{tac}$ -CbrA) y MPO518 ( $P_{tac}$ -CbrA- $\Delta$ TM), que fueron cultivadas en un medio mínimo con succinato en las mismas condiciones que el ensayo de *Western blotting* (apartado 3.6.1. de materiales y métodos).

La visualización de las estirpes mediante microscopía confocal de barrido (LCSM) permitió confirmar la localización de CbrA nativa (MPO520), mediante la detección de focos de una elevada intensidad de fluorescencia con respecto a la autofluorescencia intrínseca de *P. putida* KT2442, en el perímetro de la bacteria (Figura 48, izquierda), lo que sugería que se encontraba insertada en la membrana.



**Figura 48. Visualización de la proteína CbrA y su versión soluble CbrA-ΔTM mediante microscopía confocal.** Detección de la fluorescencia de las proteínas CbrA'-GFP en la estirpe MPO520 ( $P_{cbrA}$ -CbrA) (izquierda) y de la proteína soluble CbrA-ΔTM'-GFP en la estirpe MPO521 ( $P_{cbrA}$ -CbrA-ΔTM) (derecha) expresadas bajo su propio promotor con un microscopio confocal Zeiss LSM 880 equipado con una unidad de detección Airyscan (63X). La barra de escala se indica en la parte inferior derecha de cada imagen. Todas las imágenes obtenidas por LCSM fueron procesadas con los mismos parámetros.

Por otro lado, la estirpe MPO521 portadora de la versión de la proteína CbrA-ΔTM'-GFP en las mismas condiciones, no se posicionó en loci condensados y permaneció dispersa en el citosol (Figura 48, derecha). Asimismo, el incremento en la tasa de traducción de ambas versiones (MPO519 y MPO518), no contribuyó sustancialmente a mejorar su visualización a través de microscopía confocal (datos no mostrados).

En definitiva, los datos obtenidos en este apartado, así como la detección por *Western blotting* de CbrA en la fracción de membrana, apuntan a que los dominios transmembrana de CbrA hacen posible su anclaje en la membrana interna de la célula.

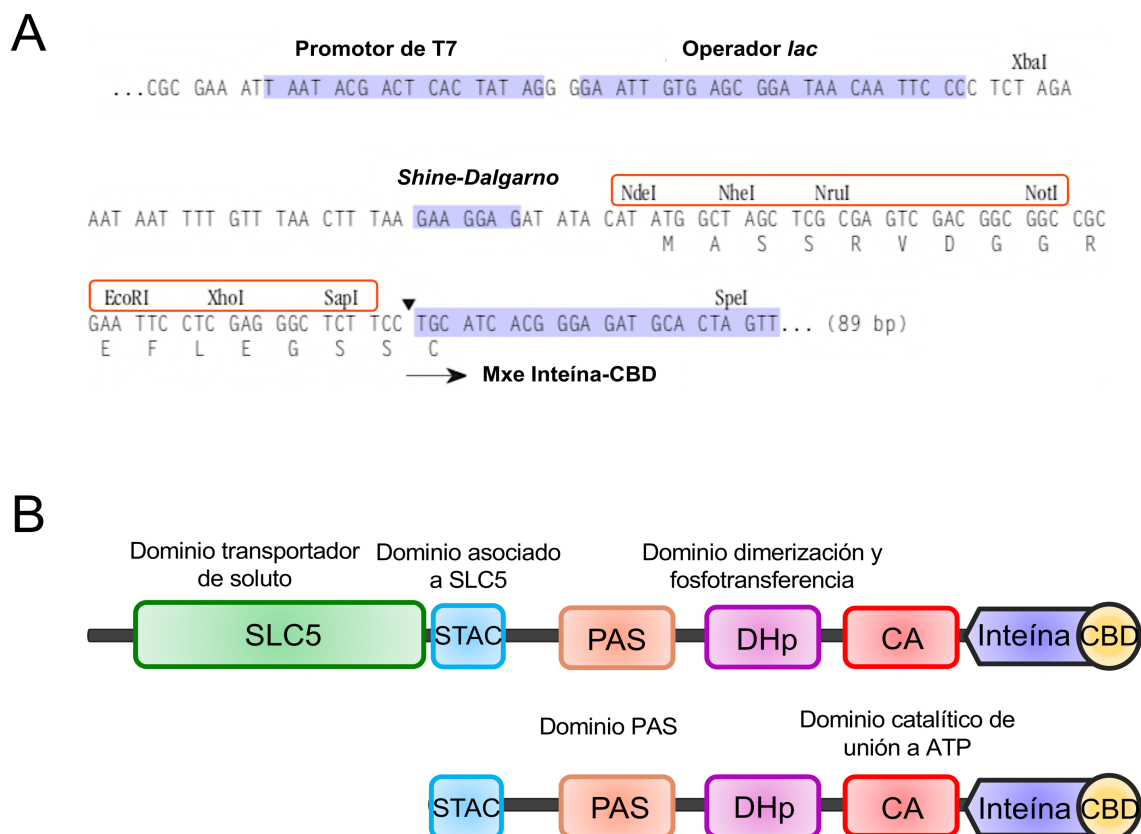
### Capítulo 3. Determinación de la naturaleza de la señal activadora del sistema CbrAB

Uno de los aspectos más relevantes para comprender el funcionamiento de los sistemas de dos componentes y su trascendencia a la hora de transformar un estímulo en una cascada de transducción de señales, es la identificación de la molécula activadora del sistema, que interacciona con la histidina quinasa para desencadenar la respuesta. Paradójicamente, la molécula activadora sigue siendo una incógnita en muchos de los sistemas de transducción de señales mejor caracterizados (AlgZ/R, KinA/Spo0F, WalK/R) (Eswaramoorthy et al., 2010; Okkotsu et al., 2014; Takada & Yoshikawa, 2018). En el capítulo 2, se ha demostrado que los dominios transmembrana de la histidina quinasa CbrA son prescindibles para detectar la señal activadora y que, por lo tanto, la interacción de la señal no se debe producir necesariamente a través de estos dominios que anclan CbrA a la membrana.

El objetivo principal de esta sección es identificar la molécula activadora o al menos estimar la naturaleza de la misma. Para ello, se procedió en primer lugar a purificar las proteínas CbrA silvestre y CbrA- $\Delta$ TM, que contiene el dominio catalítico pero que carece de los dominios TM, y a realizar diversos ensayos de interacción proteína-ligando.

#### 4.3.1. Expresión y purificación de las proteínas CbrA silvestre y CbrA- $\Delta$ TM fusionadas a la inteína

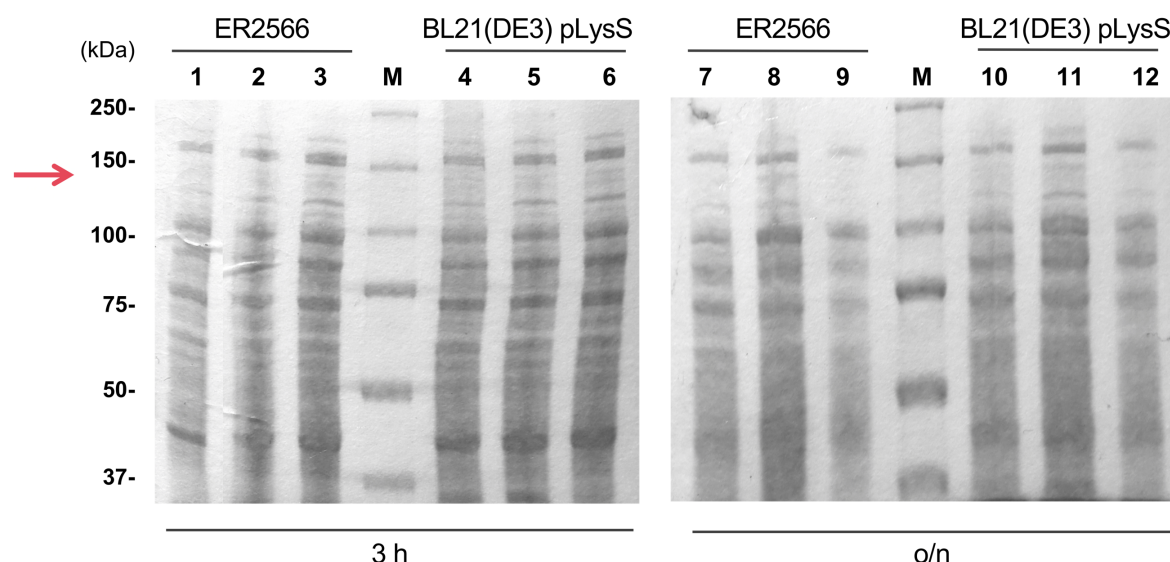
Para estudiar la capacidad de las proteínas CbrA y CbrA- $\Delta$ TM de interaccionar con un ligando que pueda actuar como señal activadora del sistema Cbr, se procedió a clonar la secuencia codificante de *cbrA* completa y la variante que carecía de los 13 dominios transmembrana, en el plásmido pTXB1 para la producción de proteínas recombinantes. Para ello, se hizo una fusión traduccional de la secuencia codificante de cada una de las versiones de CbrA a la inteína (~28 kDa) junto a un dominio de unión a quitina (6 kDa) a través de un enlace tioéster, en su extremo carboxilo terminal (Evans et al., 1998). La fusión de la inteína al extremo carboxilo terminal de CbrA y CbrA- $\Delta$ TM garantizaba que la estructura terciaria del dominio sensor, más próximo al extremo amino terminal, no se viera alterada durante el plegamiento de la proteína (Figura 49 B). La expresión de CbrA y CbrA- $\Delta$ TM en los respectivos plásmidos (pMPO1279 y pMPO1280) dio lugar a sendas proteínas de 143 kDa y 86 kDa, respectivamente. La posterior escisión del precursor con el tag inteína-CBD una vez retenida en la matriz de quitina, mediante un corte inducido por tiol, generó péptidos de 109 kDa y 52 kDa, respectivamente.



**Figura 49. Superproducción de CbrA y CbrA-ΔTM en el plásmido pTXB1. (A)** Secuencia de la región promotora del plásmido pTXB1 con el sistema de expresión del promotor de T7, el inicio de la secuencia que codifica al Tag inteína-CBD de *Mycobacterium xenopi*. Se muestra el lugar de escisión del Tag (triángulo invertido) y la región comprendida entre los sitios de clonación múltiple (*NdeI*-*SapI*) (en naranja). Adaptado de IMPACT kit (New England Biolabs). **(B)** Esquema de los dominios de CbrA (arriba) y CbrA-ΔTM (abajo) fusionadas al tag inteína-CBD en su extremo carboxilo terminal.

El sistema de producción empleado contiene el promotor del fago T7 y su secuencia *Shine-Dalgarno*, necesarios para la transcripción y traducción eficiente de la proteína de interés (Figura 49 A). Como estirpes superproductoras se emplearon las estirpes *E. coli* ER2566 y BL21 (DE3) pLysS que contienen en el cromosoma una copia del gen de la ARN polimerasa del fago T7. A su vez, la ARN polimerasa del fago T7 se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5*, un promotor reprimible por el represor LacI en ausencia del inductor IPTG. En presencia del inductor IPTG se libera la represión del promotor  $P_{lac}$  produciéndose elevados niveles de ARN polimerasa que permiten la superproducción de la proteína de interés. Además, las estirpes son deficientes en las proteasas Lon y OmpT lo cual reduciría considerablemente la proteólisis de las proteínas expresadas.

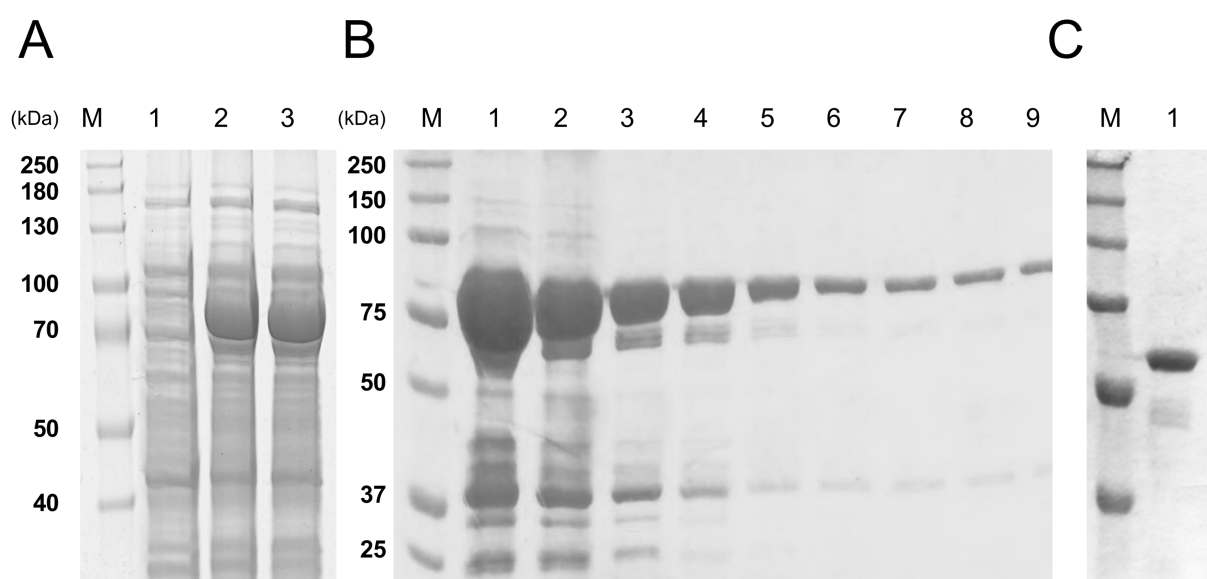
Sin embargo, siguiendo este diseño experimental no se consiguió una buena superproducción de la proteína nativa en el fondo ER2566 en ninguna de las fracciones de las muestras recogidas a las 3 h o tras toda una noche de inducción (carriles 2-3 y 8-9 en comparación con los carriles 1 y 7, respectivamente, Figura 50), probablemente debido a la composición hidrofóbica de sus 13 dominios transmembrana. Como alternativa, se utilizó la estirpe de *E. coli* BL21(DE3) pLysS que contiene el plásmido pLysS que codifica la lisozima del fago T7 la cual disminuye la expresión basal de la ARN polimerasa de T7, logrando la inhibición de la expresión del plásmido transformado en condiciones no inducidas. Las nuevas condiciones tampoco permitieron detectar una superproducción significativa de CbrA (Figura 50), probablemente por la toxicidad o dificultad en el plegamiento de los 13 dominios transmembrana del extremo Nt de CbrA, por lo que se procedió únicamente con la sobreexpresión de la versión truncada CbrA- $\Delta$ TM.



**Figura 50. Superproducción de CbrA nativa en las estirpes de *E. coli* ER2566 y BL21(DE3) pLysS.**

Se muestran las fracciones de proteína nativa antes (carriles 1, 4, 7 y 10) y después de inducir con IPTG 0.5 mM (carriles 2-3, 5-6, 8-9 y 11-12) para las estirpes *E. coli* ER2566 y BL21(DE3) pLysS. Se cargaron las muestras tras la inducción separando la fracción total (carriles 2 y 5 a las 3 h; carriles 8 y 10 tras toda la noche) de la fracción soluble (carriles 3 y 6 a las 3 h; carriles 9 y 12 tras toda la noche) para ER2566 y BL21(DE3) pLysS, respectivamente. Con una flecha roja se indica la altura aproximada a la cual debería de migrar la proteína superproducida con un tamaño de 146 kDa. M corresponde al marcador de peso molecular en kilodaltons (kDa).

Dada la dificultad para superproducir CbrA completa, se empleó la variante CbrA- $\Delta$ TM para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad con una matriz de quitina (apartados 3.6.5. y 3.6.6. de materiales y métodos). Como se ilustra en la figura 51, la superproducción de CbrA- $\Delta$ TM fue muy eficiente tras inducir un cultivo de la estirpe *E. coli* ER2566 a 16 °C toda la noche (Figura 51 A, carril 2) y además la proteína superproducida se localizó mayoritariamente en la fracción soluble (carril 3), en comparación con el extracto proteico obtenido del cultivo sin inducir (carril 1). Una vez cargada la fracción soluble en la columna y lavada con tampón de unión, se procedió al tratamiento con DTT 50 mM para romper el enlace inteína-proteína de unión a quitina, y lograr así desanclarla de la columna. Las distintas fracciones de elución de CbrA- $\Delta$ TM de la columna se recogieron en alícuotas de 12 mL y se cargó una muestra en un gel de acrilamida al 10 % para hacer un seguimiento de la purificación (Figura 51 B, carriles 1 al 9). Las fracciones se concentraron con un Centricón en un volumen de 3 mL y se obtuvo una fracción de proteína CbrA- $\Delta$ TM pura a una concentración final de 4  $\mu$ g/ $\mu$ L estimándose su pureza por visualización en gel de acrilamida de un 98 % (Figura 51 C, carril 1).



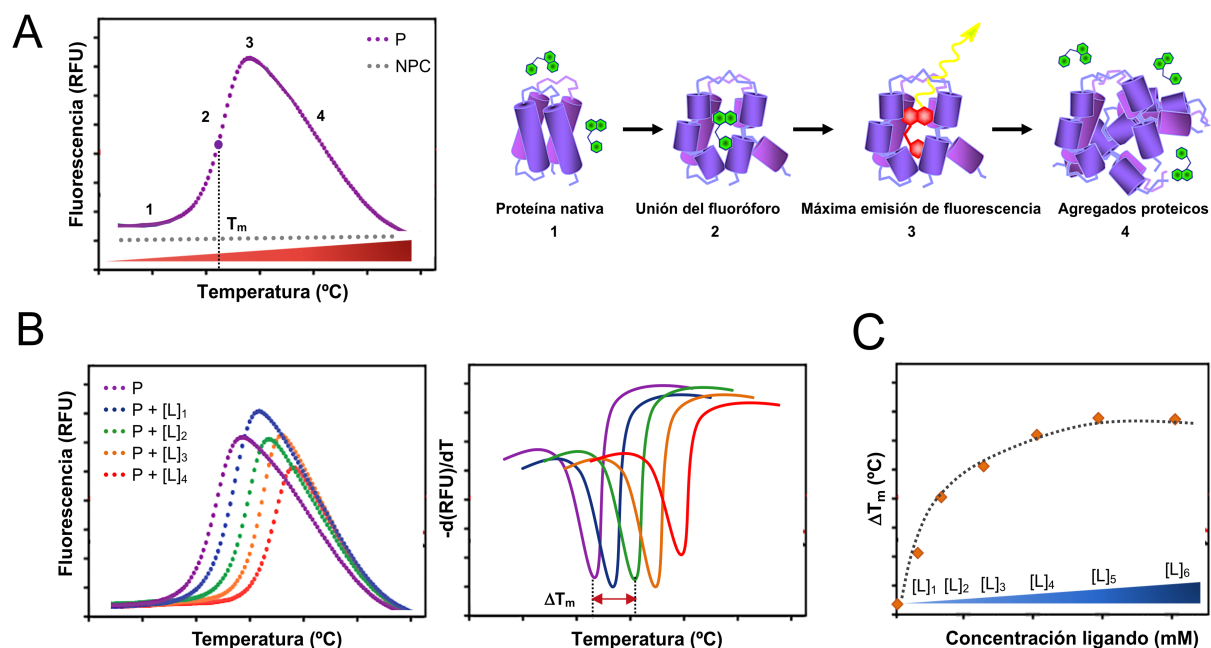
**Figura 51. Gel de acrilamida con las diferentes fracciones de la superproducción y purificación de CbrA- $\Delta$ TM.** (A) Proteína total antes de inducir (carril 1), después de la inducción con el inductor IPTG 0.5 mM (carril 2), y fracción soluble de las células inducidas (carril 3). (B) Fracciones del precursor (86 kDa) eluidas de la columna de afinidad de quitina (carriles 1-9) con tampón de unión y DTT 50 mM. (C) Preparación final de CbrA- $\Delta$ TM (52 kDa) concentrada tras escindir el precursor del tag inteína-CBD. M corresponde al marcador de peso molecular en kilodaltons (kDa).

#### 4.3.2. Estudio de la interacción de CbrA- $\Delta$ TM con distintos ligandos mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF)

Una vez purificada la proteína CbrA- $\Delta$ TM se procedió a hacer un escrutinio con moléculas de diversa naturaleza para intentar determinar la posible interacción con la molécula efectora (véase apartado 4.3.2.2.). De todas las opciones metodológicas que existen para detectar interacciones proteína-ligando, se optó por hacer un primer escrutinio utilizando la técnica de la fluorimetría diferencial de barrido (DSF) debido a la posibilidad de ensayar múltiples condiciones de forma simultánea. Esta técnica permite detectar variaciones en la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de una proteína como consecuencia de su interacción con un ligando, y requiere cantidades muy pequeñas de proteína al realizarse en las placas multipocillo utilizadas rutinariamente en el laboratorio. La cuantificación de la fluorescencia en presencia de los distintos ligandos se monitoriza en un termociclador de PCR a tiempo real, en una rampa de temperatura entre 20 °C y 95 °C. La interacción específica de un ligando con una proteína suele incrementar el valor de la  $T_m$  ( $\Delta T_m > 0$ ) que se refleja como un aumento en la estabilidad térmica de la proteína (Figura 52 B). Por el contrario, los desplazamientos térmicos negativos ( $\Delta T_m < 0$ ) no pueden ser explicados con el modelo termodinámico actual lo que genera controversia a la hora de establecer un modelo. Ciertos autores asocian este fenómeno a la unión del ligando tanto a la forma desnaturalizada de la proteína como a la conformación nativa (Fernández et al., 2016; Scott et al., 2016; Waldron & Murphy, 2003).

En la figura 52 A se ilustra la variación de la fluorescencia emitida por una proteína modelo asociada a un fluoróforo en presencia de un ligando ficticio, en función de la temperatura. El panel B muestra las curvas de fusión en función de la concentración del ligando (izquierda) y la representación de la primera derivada negativa de las unidades de fluorescencia relativa con respecto a la temperatura ( $-d(RFU)/dT$ ), a la derecha. Este tipo alternativo de representación permite visualizar con mayor claridad el punto de inflexión de la curva correspondiente a la  $T_m$ , momento en el que coexisten el 50 % de la proteína en forma nativa y el 50 % desnaturalizada (Lo et al., 2004). Asimismo, se ha establecido una correlación entre la concentración de ligando y el aumento progresivo de la estabilidad de la proteína (Figura 52 B y C) (Bai et al., 2019; Niesen et al., 2007). Considerando dos ligandos a distintas concentraciones que generan el mismo desplazamiento térmico  $\Delta T_m$ , el ligando que está a una concentración más alta presenta una constante de disociación ( $K_D$ ) mayor demostrando una afinidad débil por la proteína y, viceversa (Scott et al., 2016).





**Figura 52. Principio de la fluorimetría diferencial de barrido (DSF).** (A) Base molecular de la fluorimetría diferencial de barrido. Se muestra la fluorescencia emitida por el fluoróforo asociado a una proteína en función del incremento de la temperatura. La  $T_m$  representa la temperatura a la cual coexiste el 50 % de proteína nativa con el 50 % de proteína desnaturalizada. (1) La proteína nativa (morado) se incubó con el fluoróforo SYPRO Orange (verde). (2) El incremento de temperatura provoca que la proteína se desnaturalice progresivamente y el fluoróforo entre en contacto con regiones hidrofóbicas de la proteína. (3) La proteína se desnaturaliza y se obtiene un pico máximo de fluorescencia. (4) La proteína desnaturalizada comienza a agregarse, liberándose del fluoróforo lo que provoca la disminución de la fluorescencia. Como control negativo se establece el tampón sin proteína, denominado *No Protein Control* (línea punteada gris). (B) Curvas de fusión de una proteína (P) en presencia de concentraciones crecientes de ligando ( $[L]_{1-6}$ ) representado como la emisión de fluorescencia (RFU) (izquierda) y como la primera derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-d(RFU)/dT$ ) (derecha). (C) Dependencia de la termoestabilidad de una proteína de la concentración de ligando. La línea continua gris indica el ajuste de los datos a una cinética de saturación. Adaptado de (Abbott et al., 2017; Bai et al., 2019; Pantoliano et al., 2001).

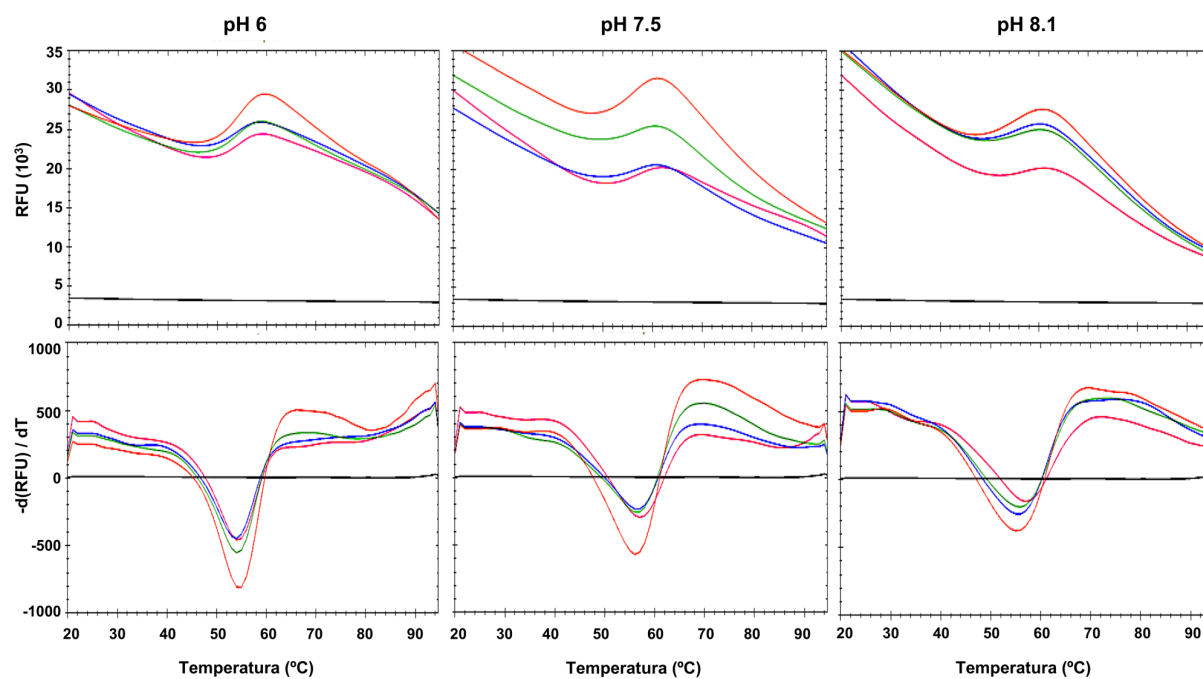
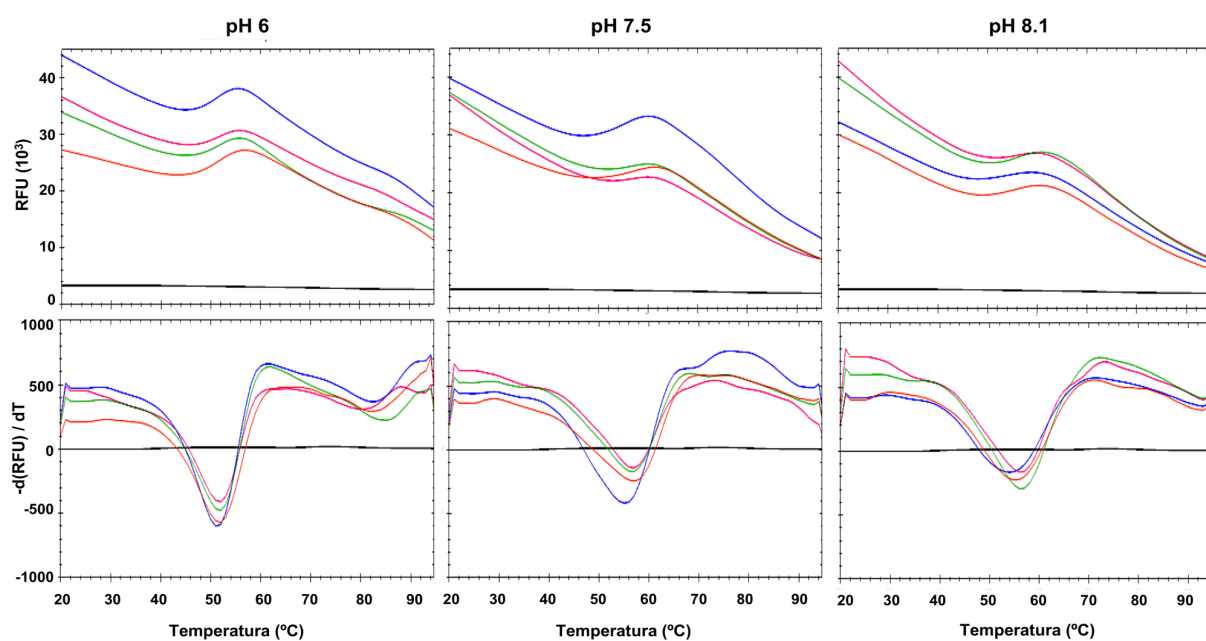
El fluoróforo empleado para el ensayo de DSF fue SYPRO Orange (Sigma Aldrich) por su óptima relación señal-ruido y su excitación a una longitud de onda, 492 nm, a la cual disminuye la probabilidad de interferencia con alguna molécula pequeña presente en la muestra. En un cribado preliminar de posibles ligandos con capacidad de interactuar con la proteína CbrA- $\Delta$ TM, se llevó a cabo la técnica de fluorimetría diferencial de barrido descrita por (Niesen et al., 2007) con algunas modificaciones (véase materiales y métodos apartado 3.8.1.).

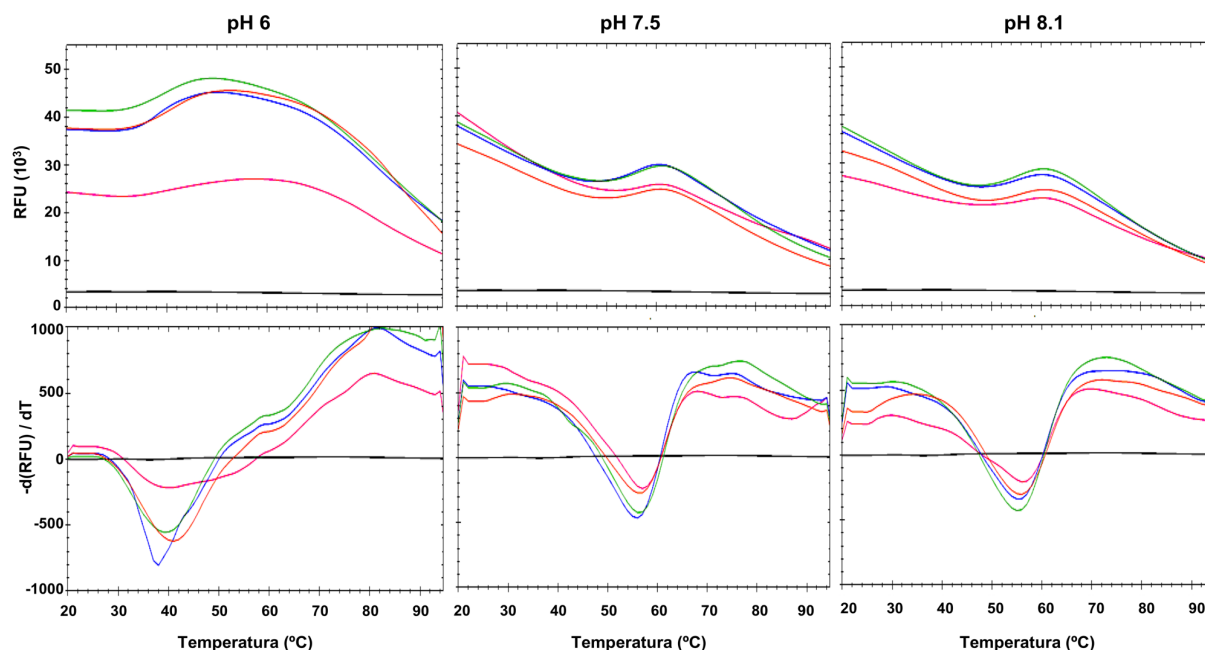
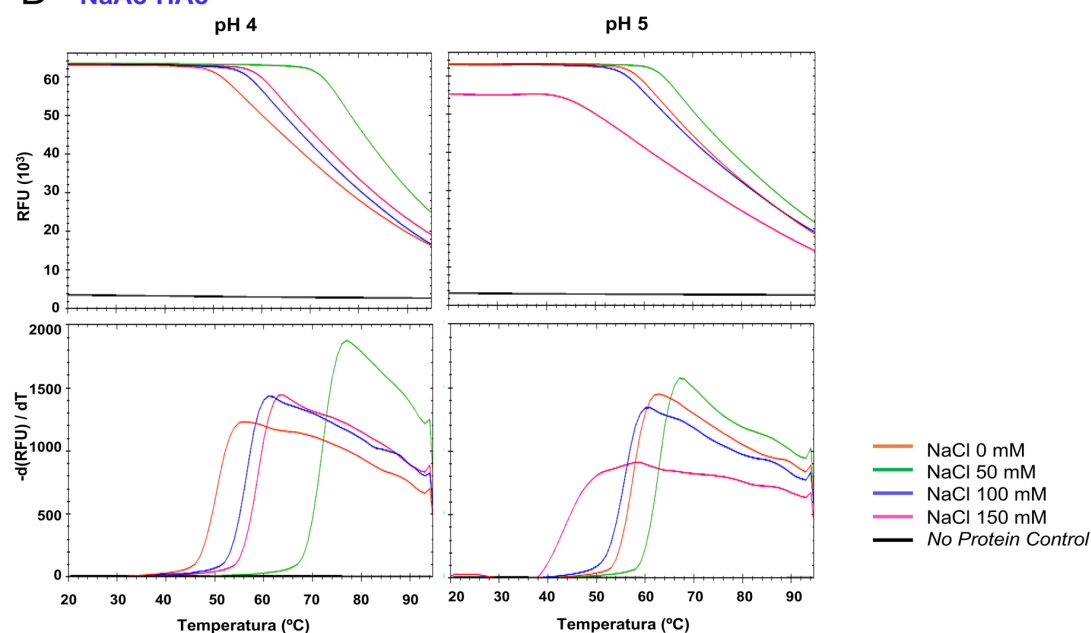
#### 4.3.2.1. Optimización de las condiciones de máxima estabilidad de la proteína CbrA- $\Delta$ TM para el ensayo de DSF

La detección de cambios en la temperatura de desnaturalización de una proteína por su interacción con un ligando requiere una curva precisa y sin posibles interferencias ocasionadas por la presencia de sales, un pH desfavorable u otros factores. Por esta razón, se modificaron una serie de parámetros que permitían determinar las condiciones óptimas de estabilidad de la proteína en lo que se denominó curvas de normalización. En ellas, se analizó la curva de desnaturalización de CbrA- $\Delta$ TM en condiciones donde se variaba el tipo de tampón (Tris HCl, HEPES-NaOH, MES-NaOH y acetato de sodio-ácido acético (NaAc-HAc)), el rango de pH con capacidad tamponadora (6, 7.5 y 8.1, para los tres primeros tampones, respectivamente; 4 y 5 para el último) y la concentración de NaCl (de 0 a 150 mM), cuya fuerza iónica puede alterar la capa de hidratación de la proteína e inducir su precipitación. En todos los ensayos la concentración final de la proteína fue de 20  $\mu$ M.

Los principales rasgos que definen las condiciones óptimas de estabilidad de una determinada proteína se aprecian en gráficas donde los valores de la curva de fluorescencia superen los valores basales correspondientes a la fluorescencia intrínseca del tampón sin proteína (control negativo sin proteína denominado *No Protein Control*, NPC) (Figura 52 A) así como la obtención de un máximo de fluorescencia correspondiente a la transición del estado nativo al estado desnaturalizado. Esta transición debe describir un pico profundo y definido al representar la primera derivada negativa de la fluorescencia, de modo que permita la estimación precisa de la  $T_m$  (Figura 52 B).

Como primera aproximación, se evaluó la termoestabilidad de la proteína CbrA- $\Delta$ TM en función del tampón, la concentración de NaCl y pH. En la figura 53 se muestran las curvas de fusión obtenidas en el ensayo de DSF de la proteína CbrA- $\Delta$ TM en distintas concentraciones de NaCl (0, 50, 100 y 150 mM; líneas de colores en las gráficas) y en función del pH (6, 7.5, 8.1, 4 y 5) en distintos tampones a 100 mM (Tris HCl, HEPES-NaOH, MES-NaOH y NaAc-HAc; gráficas A-D). En la mayoría de las gráficas se observa una única transición del estado nativo al estado desnaturalizado de la proteína CbrA- $\Delta$ TM, centrado en valores de  $T_m$  de 50 °C y 60 °C, lo que permite estimar la  $T_m$  ajustando los datos a la ecuación de Boltzmann o utilizando el software Bio-Rad CFX Manager.

**A** Tris HCl**B** HEPES-NaOH

**C MES-NaOH****D NaAc-HAc**

**Figura 53. Efecto del tipo de tampón, el pH y la concentración salina en la termoestabilidad de la proteína CbrA-ΔTM.** Se representan las curvas de fusión obtenidas por DSF como unidades relativas de fluorescencia (RFU) emitidas por la proteína CbrA-ΔTM a lo largo de una rampa de temperatura de 20 °C a 95 °C. Como representación alternativa, se muestra la primera derivada negativa de las unidades relativas de fluorescencia en función de la temperatura ( $-d(RFU)/dT$ ). La proteína a 20 μM fue expuesta en los tampones Tris HCl (A), HEPES-NaOH (B), MES-NaOH (C) 100 mM a pH 6 (izquierda), 7.5 (centro) y 8.1 (derecha) y NaAc-HAc (D) 100 mM a pH 4 (izquierda) y 5 (centro). Además, se evaluó el efecto salino por adición de NaCl de 0 mM (naranja), 50 mM (verde), 100 mM (azul) y 150 mM (rosa). El control negativo (*No Protein Control*) corresponde a cada uno de los tampones independientes sin proteína.

En base a estas premisas, se analizó en primer lugar el efecto global de cada tampón en la estabilidad de la estructura de CbrA- $\Delta$ TM. De todos los tampones analizados, los que se asemejan a la curva teórica donde la estructura de CbrA- $\Delta$ TM es más estable son Tris HCl y HEPES-NaOH (Figura 53 A y B). Por el contrario, los valores de fluorescencia obtenidos en las condiciones de MES-NaOH y NaAc-HAc no reproducen la curva esperada al no distinguirse ningún máximo de fluorescencia (Figura 53 C y D). Además, es destacable los elevados niveles de fluorescencia iniciales cuando CbrA- $\Delta$ TM es expuesta en el tampón NaAc-HAc sugiriendo un posible efecto desnaturalizante de estas condiciones que conllevaría una exposición temprana de las regiones hidrofóbicas al fluoróforo empleado.

Usando el tampón Tris HCl, la adición de NaCl provocó una desestabilización progresiva de la proteína independientemente del pH ensayado (6, 7.5, 8.1). Este efecto se vio reflejado en los máximos de fluorescencia cuyos valores no superaban los niveles iniciales de fluorescencia. A pesar de ello, el único pico de las curvas de fusión en Tris HCl con mayor definición se distinguió a pH 6 sin adición de NaCl (0 mM; línea naranja) (Figura 53 A). En el tampón HEPES-NaOH, la termoestabilidad de CbrA- $\Delta$ TM se vio comprometida con el pH, mejorando con la acidificación del medio. A diferencia de la condición anterior, la adición de NaCl en HEPES-NaOH contribuyó ligeramente a estabilizar la estructura proteica (Figura 53 B). Por tanto, los valores de  $T_m$  para los tampones Tris HCl y HEPES-NaOH se situaron entre 50 °C y 60 °C y, de todos ellos, la condición óptima para la estabilidad de CbrA- $\Delta$ TM fue el tampón Tris HCl a pH 6 y sin adición de NaCl siendo el único caso en el que el valor del pico máximo de fluorescencia superó la señal inicial de fluorescencia. La  $T_m$  estimada para dicha condición fue de 53 °C (Figura 53 A).

Con el fin de asemejarse a las condiciones *in vitro* de la purificación de CbrA- $\Delta$ TM se redujo la concentración del tampón Tris HCl a 20 mM y se comprobó que el comportamiento de la proteína era el mismo que cuando se usó 100 mM. Con este ajuste se logró incrementar significativamente la fluorescencia emitida indicando que el ensayo era más sensible lo cual permitiría detectar cambios más sutiles (datos no mostrados). La  $T_m$  de CbrA- $\Delta$ TM estimada para la nueva condición fue de  $50.4 \pm 0.5$  °C.

#### 4.3.2.2. Rastreo de posibles ligandos que interaccionen con CbrA- $\Delta$ TM

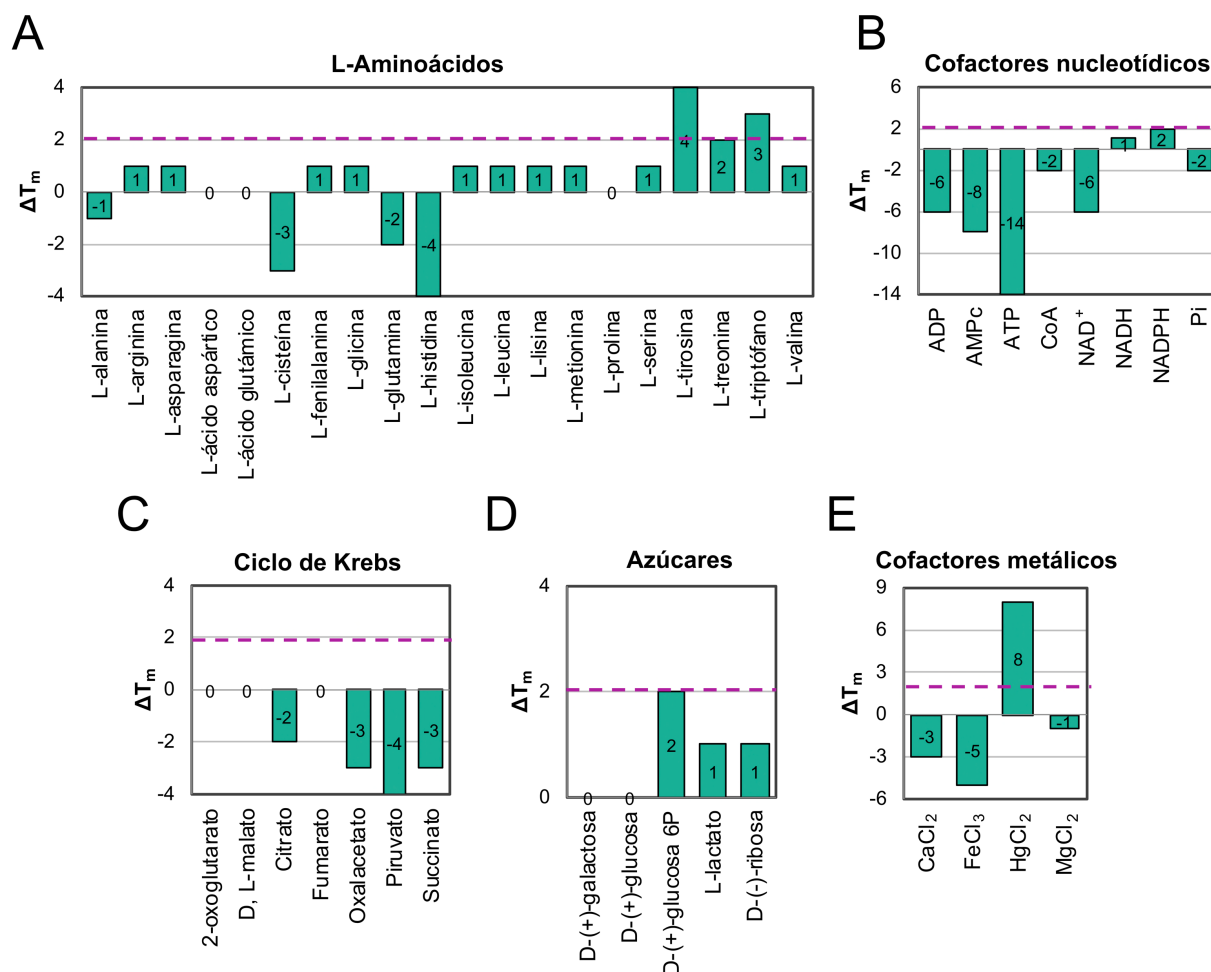
La optimización de las condiciones de estabilidad de la proteína CbrA- $\Delta$ TM como etapa inicial en el ensayo DSF dio paso al escrutinio de posibles ligandos que interaccionen con CbrA. La diversidad en la naturaleza de moléculas efectoras que interaccionan con histidina quinasas descritas en la bibliografía dificulta la identificación de las mismas aunque la

identificación de las condiciones de inducción de un sistema de transducción de señales en muchos casos pueden dar indicios sobre la naturaleza de la señal. El sistema CbrAB se induce en respuesta a la limitación de carbono y además supone una modificación de los flujos metabólicos que ocasiona una acumulación de 2-oxoglutarato (2-OG), y consecuentemente, un desequilibrio de la relación 2-oxoglutarato/glutamina (Valentini et al., 2014). La estrecha relación con el ciclo de Krebs y el papel crucial del glutamato al actuar como nexo entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno lo convierten en un sustrato universal y candidato a analizar. Además, se evaluó la posible interacción con diversos compuestos más o menos fáciles de asimilar como fuente de carbono por *P. putida*, así como algunos cofactores que se han descrito en la bibliografía que interaccionan con los dominios PAS de histidina quinasas de distinta naturaleza.

Con estas premisas, los ligandos seleccionados para el escrutinio de su posible interacción con el dominio sensor de CbrA se agruparon en seis categorías:

- ♦ *L-aminoácidos*: se emplearon los 20 aminoácidos proteinogénicos (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina).
- ♦ *Azúcares*: D-(+)-galactosa, D-(+)-glucosa, D-(+)-glucosa 6P, L-lactato y D-(-)-ribosa.
- ♦ *Intermediarios del ciclo de Krebs*: 2-oxoglutarato, D,L-malato, citrato, fumarato, oxalacetato, piruvato y succinato.
- ♦ *Cofactores*: flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), grupo hemo, coenzima A, ADP, AMPc, ATP, NAD<sup>+</sup>, NADH, NADPH y Pi.
- ♦ *Cofactores metálicos*: CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>.
- ♦ *Otros*: ácido *p*-cumárico, ácidos carboxílicos C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>.

De los 20 aminoácidos evaluados, L-tyr, L-trp y L-thr provocaron un incremento significativo en la  $T_m$  de CbrA- $\Delta$ TM ( $\Delta T_m$  de 4 °C, 3 °C y 2 °C, respectivamente), que suponían valores por encima del umbral de significación establecido (Giuliani et al., 2008; Krishna et al., 2013) (Figura 54 A). Por otro lado, se registraron valores de  $\Delta T_m$  negativos para los aminoácidos L-ala, L-cys, L-gln y L-his, que indicaban una desestabilización térmica de la estructura proteica, y para el resto de los aminoácidos no se detectaron cambios, o cambios no significativos en la  $T_m$  de la proteína. En resumen, los ligandos pertenecientes a la categoría de aminoácidos con posible interacción con CbrA- $\Delta$ TM fueron L-tyr, L-trp y L-thr.



**Figura 54. Cribado de alto rendimiento para la detección de ligandos de la proteína CbrA- $\Delta$ TM mediante fluorimetría diferencial de barrido.** Las barras representan los cambios de  $T_m$  para cada uno de los 44 compuestos con respecto a la  $T_m$  de la proteína libre de ligando de 50 °C. Los compuestos ensayados fueron agrupados en cinco categorías: L-aminoácidos (A), cofactores nucleotídicos (B), intermediarios del ciclo de Krebs (C), azúcares (D) y cofactores metálicos (E). La línea rosa discontinua indica el umbral  $\Delta T_m$  de 2 °C considerado como dato significativo. Los valores corresponden a una única réplica técnica.

Del grupo de cofactores nucleotídicos ensayados, únicamente la presencia del NADPH supuso un incremento significativo en la  $T_m$  de CbrA- $\Delta$ TM ( $\Delta T_m = 2$  °C) (Figura 54 B). Sorprendentemente, las moléculas de ATP, AMPc, ADP y NAD<sup>+</sup> provocaron un decremento en la  $T_m$  de 6 a 14 veces lo que parece indicar que estos nucleótidos desestabilizan la estructura de CbrA- $\Delta$ TM. Este es particularmente sorprendente en el caso del ATP, con el cual esperábamos una interacción positiva debido a la presencia de un sitio de unión de ATP y un residuo susceptible de fosforilación en CbrA ubicado en la His766 del dominio CA.

Los intermediarios del ciclo de Krebs como citrato, oxalacetato, fumarato y succinato también ocasionaron un descenso en la  $T_m$  y ninguno de ellos parece estabilizar la estructura de la proteína (Figura 54 C). Por otro lado, la D-(+)-glucosa 6P provocó un  $\Delta T_m$  de 2 °C, mientras que otros azúcares como el L-lactato y la D-(-)-ribosa tuvieron un efecto menor ( $\Delta T_m = 1$  °C) (Figura 54 D). En la categoría de cofactores metálicos se registró un  $\Delta T_m$  significativo de 8 °C para el catión mercurio ( $Hg^{+2}$ ) indicando un incremento notable en la estabilidad de la proteína CbrA- $\Delta TM$ , mientras que el  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Mg^{2+}$  provocaron un efecto desestabilizador (Figura 54 E).

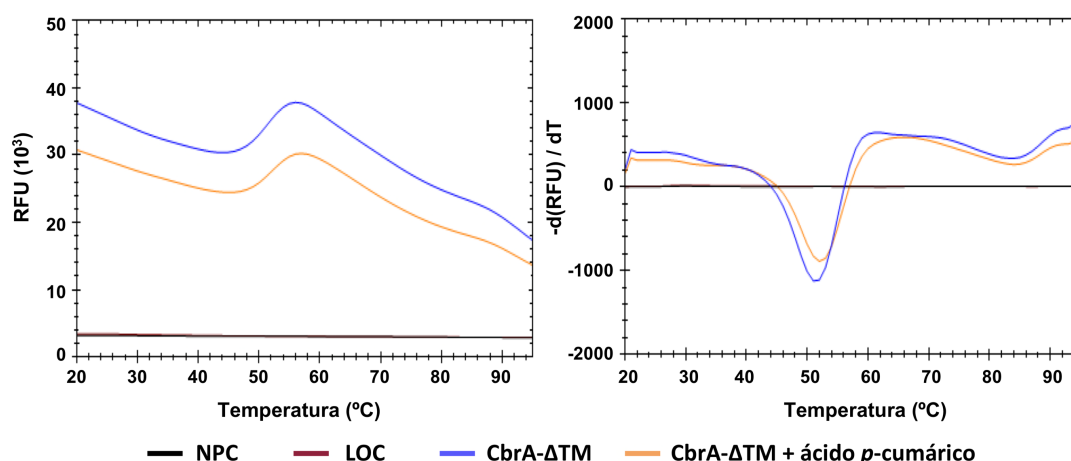
El análisis de la estabilidad térmica de CbrA- $\Delta TM$  en presencia de los cofactores FAD, FMN y del grupo hemo mediante DSF no fue posible dada las propiedades fluorescentes de dichas moléculas cuyos espectros de emisión (470-570 nm) coinciden con el rango de longitud de onda de emisión del fluoróforo SYPRO Orange (575 nm) (datos no mostrados).

En resumen, según los datos de los ensayos de DSF las moléculas candidatas a interactuar con el dominio sensor de CbrA- $\Delta TM$  fueron la L-tyr, L-thr, L-trp, el NADPH, la D-(+)-glu 6P y el  $Hg^{+2}$ , cuya interacción directa con nuestra proteína deberá ser evaluada en un futuro a través de calorimetría de titulación isotérmica dado que la técnica de DSF proporciona una medida indirecta de una posible interacción por cuantificación de la  $T_m$ , parámetro indicativo de la estabilidad térmica.

#### 4.3.2.3. Predicción de ligandos en función de la estructura del dominio PAS

La diversidad de ligandos funcionales que interactúan con histidina quinasas a través de un dominio PAS descritos en la bibliografía es grande. Para hacer una predicción de posibles ligandos que pudieran interactuar con CbrA, se realizó un análisis de la estructura tridimensional de su dominio PAS y se comparó con el resto de proteínas cristalizadas almacenadas en la base de datos de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) (<http://www.rcsb.org>). La proteína que mostró una similitud estructural al dominio PAS de CbrA fue la histidina quinasa Ppr (UniProt ID: Q9X2W8; PDB ID: 1mzu) de *Rhodospirillum centenum*, cuyo dominio del fotosensor PYP (*Photoactive Yellow Protein*) regula la actividad catalítica de Ppr por absorción de un fotón de luz azul cuando permanece unida al ácido *p*-cumárico (Rajagopal & Moffat, 2003). Por ello, se evaluó la posible interacción del ácido *p*-cumárico con la proteína CbrA- $\Delta TM$  mediante DSF. La figura 55 muestra una estabilización de CbrA- $\Delta TM$  con un  $\Delta T_m = 1$  °C, que no alcanza el umbral de significación establecido para este ensayo con anterioridad.





**Figura 55. Evaluación de la termoestabilidad de CbrA- $\Delta$ TM con el ácido *p*-cumárico por fluorimetría diferencial de barrido.** Se representan las curvas de fusión obtenidas por DSF de la proteína CbrA- $\Delta$ TM (azul) en presencia del ácido *p*-cumárico expresadas como unidades relativas de fluorescencia (RFU) (izquierda) y como la primera derivada negativa de las RFU en función de la temperatura ( $-d(\text{RFU})/dT$ ) (derecha) a lo largo de una rampa de temperatura entre 20 °C y 95 °C. Como controles negativos se establecieron NPC en el tampón Tris HCl 20 mM pH 6 sin proteína y LOC con el ligando correspondiente en cada caso.

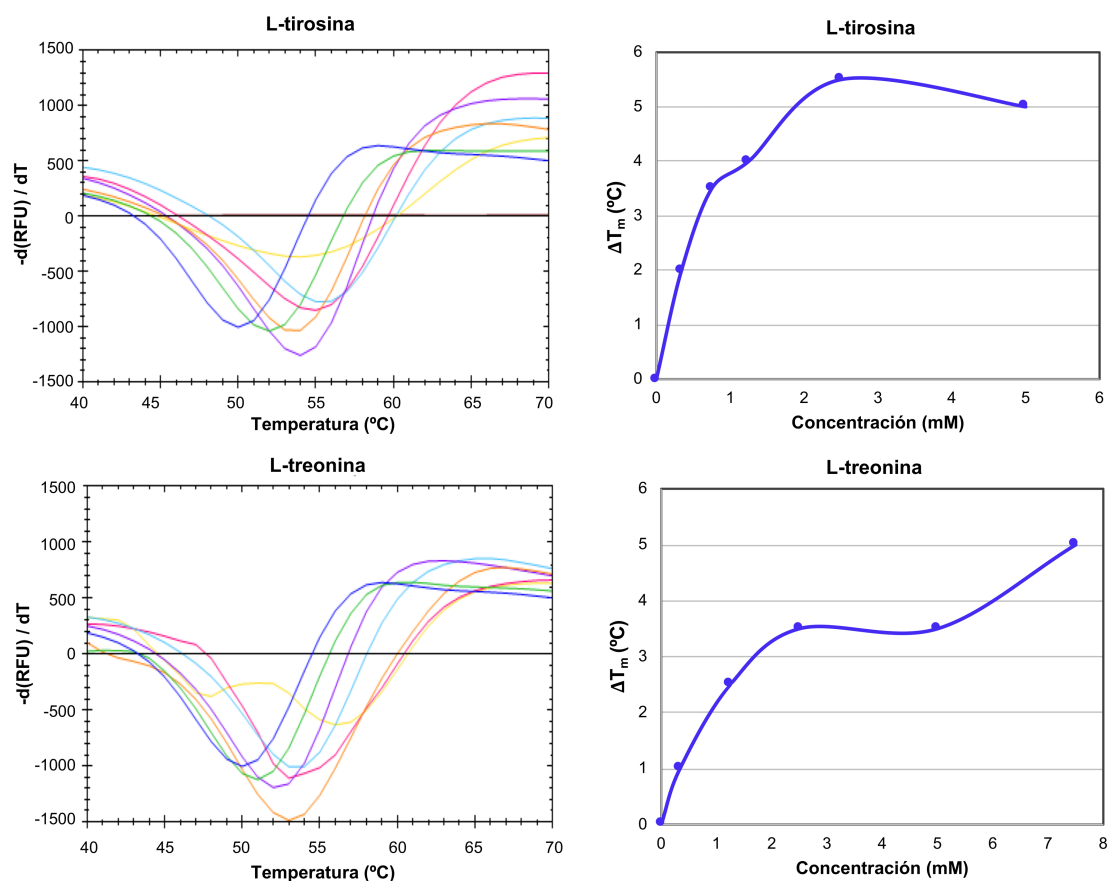
Tras comprobar que el principal ligando predicho por similitud de estructura tridimensional del dominio PAS, el ácido *p*-cumárico, no potenciaba la termoestabilidad de CbrA- $\Delta$ TM, se procedió a titular los 6 candidatos seleccionados en el apartado 4.3.2.2.

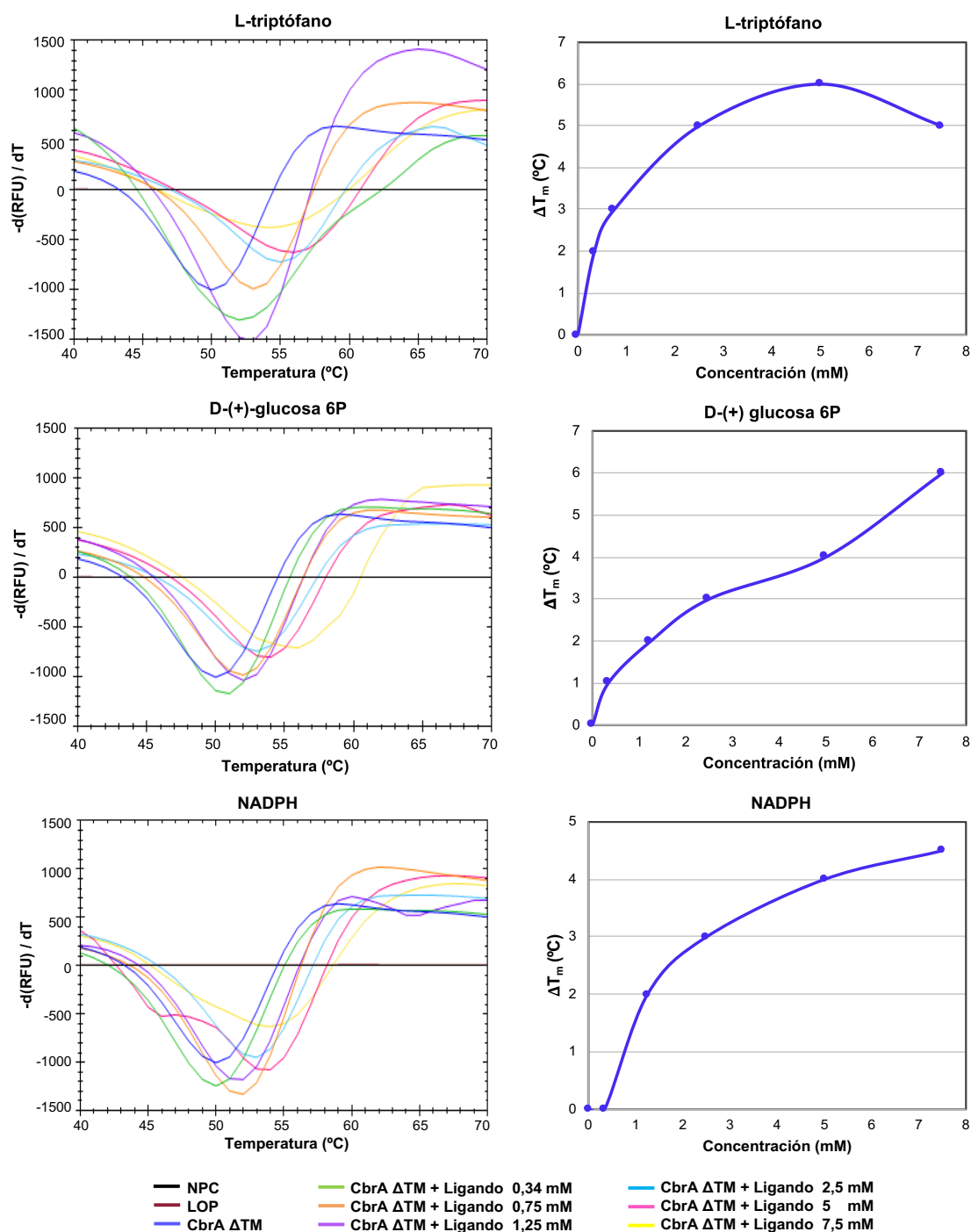
#### 4.3.2.4. Titulación de los ligandos predichos para CbrA- $\Delta$ TM mediante DSF

Los ensayos de fluorimetría diferencial de barrido permitieron identificar 6 compuestos que, al interaccionar con CbrA- $\Delta$ TM, aumentan su termoestabilidad. Para demostrar el aumento de la estabilidad de la proteína por su interacción con un ligando, se realizó una titulación con concentraciones crecientes de cada ligando. Esto permite obtener una cinética de unión y estimar la constante de asociación junto a ensayos de calorimetría de titulación isotérmica, como se ha descrito en la bibliografía (Boivin et al., 2013; Niesen et al., 2007).

La figura 56 representa el efecto de la adición de concentraciones crecientes (0.34, 0.75, 1.25, 2.5, 5 y 7.5 mM) de los ligandos L-tyr, L-thr, L-trp, D-(+)-glu 6P y NADPH, sobre la estabilidad de CbrA- $\Delta$ TM. La  $T_m$  de la proteína nativa CbrA- $\Delta$ TM en ausencia de ligando fue de  $50.4 \pm 0.5$  °C (véase apartado 4.3.2.1.), y el incremento de la temperatura debe ser proporcional al aumento de la concentración de un determinado ligando, ajustándose a una cinética de saturación (véase apartado 4.3.2.).

La incubación de CbrA- $\Delta$ TM con la mayoría de los ligandos (L-tyr, L-thr, L-trp, D-(+)-glu 6P y NADPH) condujo a cambios significativos de  $T_m$  en función de la dosis de ligando, incrementándose los valores de  $T_m$  conforme la estabilidad térmica de la proteína se veía favorecida (Figura 56). Se obtuvo un desplazamiento térmico ( $\Delta T_m$ ) de 6 °C para L-trp a 5 mM y D-(+)-glu 6P a 7.5 mM, un  $\Delta T_m$  de 5.5 °C para L-tyr a 2.5 mM, un  $\Delta T_m$  de 5 °C para L-thr a 7.5 mM y un  $\Delta T_m$ = 4.5 °C para NADPH a la máxima concentración testada (Figura 56). Por el contrario, no se pudo establecer una correlación con la adición de  $Hg^{+2}$  ya que por encima de 1.25 mM no se apreció ninguna alteración en la  $T_m$  (datos no mostrados). Sin embargo, se reprodujo el comportamiento térmico de CbrA- $\Delta$ TM en presencia de los ligandos a una concentración de 1 mM aproximadamente tal y como se observó en el cribado preliminar (Figura 54), sugiriendo de nuevo una interacción probable con la proteína en estudio.





**Figura 56. Estabilidad de la proteína CbrA- $\Delta$ TM en función de la concentración de L-tirosina, L-treonina, L-triptófano, D-(+)-glucosa 6P, NADPH.** A la izquierda, las curvas de fusión de CbrA- $\Delta$ TM obtenidas por DSF representadas como la primera derivada negativa de las unidades relativas de fluorescencia en función de la temperatura ( $-d(\text{RFU})/dT$ ) en un intervalo de temperatura entre 40 °C y 70 °C. A la derecha, se muestra la variación de la temperatura de fusión ( $\Delta T_m$ ) de la proteína CbrA- $\Delta$ TM (azul) a 20  $\mu\text{M}$  con respecto a diferentes concentraciones de ligandos: 0.34 mM (verde), 0.75 mM (naranja), 1.25 mM (morado), 2.5 mM (celeste), 5 mM (rosa) y 7.5 mM (amarillo). Los controles negativos NPC (*No Protein Control*) y LOC (*Ligand Only Control*) corresponden al tampón Tris HCl 20 mM pH 6 sin proteína y con el ligando adecuado, respectivamente.

Con el ajuste de los datos a una cinética de saturación se estimó unos  $R^2$  de 0.99 para D-(+)-glu 6P y 0.98 para NADPH. A diferencia de los compuestos anteriores, el  $R^2$  estimado para los aminoácidos L-tyr y L-trp fue de 0.97 y para L-thr fue de 0.96, respectivamente, sugiriendo un peor ajuste a la cinética de saturación.

El análisis de los resultados aportados por la titulación de los seis ligandos seleccionados no permite excluir *a priori* a ninguno de ellos al requerirse más réplicas del ensayo y su validación con futuras aproximaciones experimentales. Aunque el incremento de la dosis de la mayoría de los ligandos contribuye a la estabilidad de CbrA- $\Delta$ TM, la D-(+)-glu 6P y el NADPH reflejan un mejor ajuste a la cinética de saturación, por lo que son buenos candidatos a estudiar mediante métodos de interacción directa por técnicas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

## Capítulo 4. Estudio de la posible interacción entre distintos sistemas reguladores en la asimilación de carbono en *P. putida*

El sistema CbrAB es un sistema global de regulación que controla múltiples rutas metabólicas implicadas en distintos aspectos de la fisiología bacteriana, donde es preciso una minuciosa cooperación entre los múltiples componentes (factores de transcripción, ARNp reguladores y factores sigma/ anti-sigma), para garantizar el funcionamiento adecuado de un determinado proceso celular. Uno de los ambiciosos objetivos de esta Tesis consiste en integrar todos los procesos implicados en la respuesta a una señal a través de CbrAB, e identificar su transmisión a nivel regulatorio a los distintos niveles.

Se ha demostrado que la actividad del sistema de represión catabólica Hfq/Crc, depende en gran manera de la capacidad que tiene CbrB de activar la expresión de los ARNs reguladores CrcZ y CrcY (Amador et al., 2010; Corona et al., 2018; Sonnleitner et al., 2012). Además, la integración de los factores  $\sigma^{ECF}$  en cascadas de regulación de TCSs, ha podido definir interacciones que conllevan tanto la detección y transmisión de una señal ambiental como la variación en la expresión génica. En *P. aeruginosa* en particular, se ha descrito que el factor  $\sigma^{ECF}$  SigX juega un papel esencial en el mantenimiento de la fluidez de la pared celular. Además un mutante *sigX<sup>-</sup>* está desreprimido catabólicamente y presenta niveles elevados de CrcZ (Fléhard et al., 2018), lo que podría estar revelando una posible interacción con CbrAB.

Ante el posible solapamiento de los regulones de CbrB, Crc y SigX se planteó la hipótesis de que existiese de uno o varios elementos que actuaran como nexo común en una compleja red jerárquica de elementos reguladores. En el presente capítulo, profundizaremos en la conexión más cercana entre el sistema CbrAB y el complejo Hfq/Crc e iniciaremos la búsqueda de factores hasta ahora desconocidos que permitan esclarecer las relaciones entre ellos.

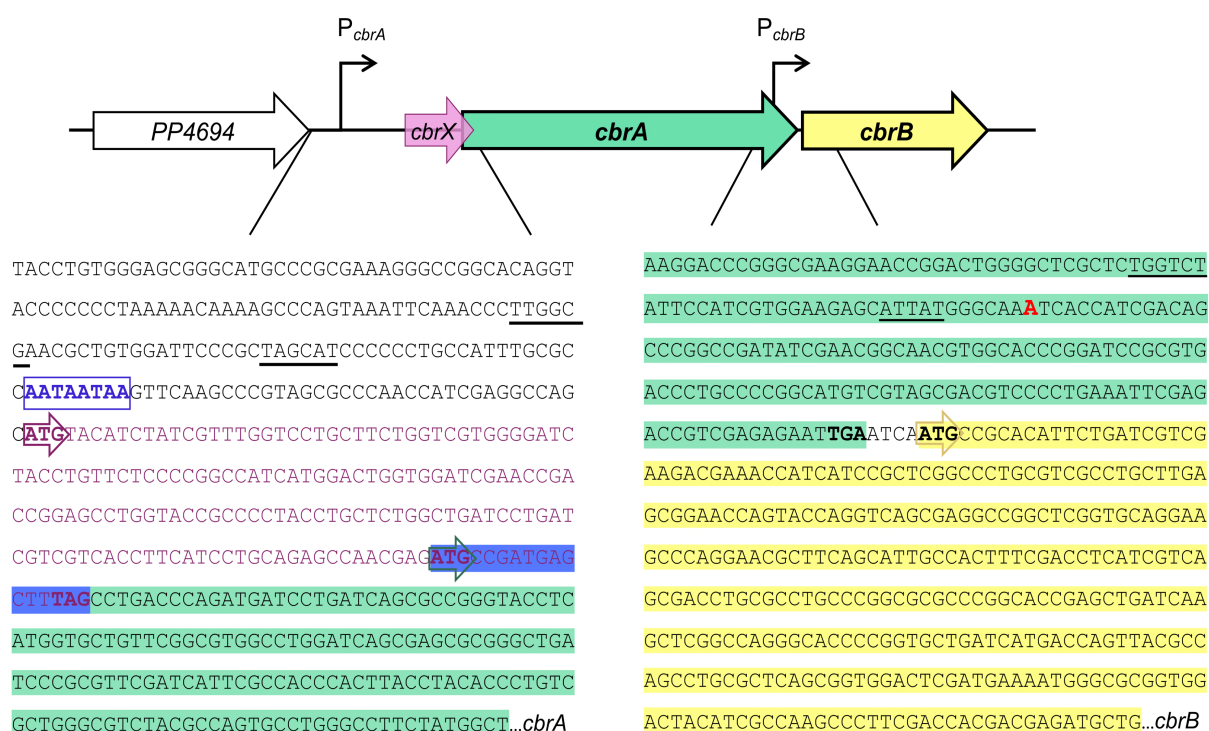
### 4.4.1. El regulón de Hfq/Crc

En condiciones de represión catabólica, la formación del complejo Hfq/Crc establece una jerarquía de regulación traduccional en *Pseudomonas* donde el complejo hexamérico formado por Hfq se une a sitios CA de un ARNm concreto y, Crc estabiliza esa unión (Sonnleitner et al., 2009; Sonnleitner & Bläsi, 2014). En ausencia de una fuente de carbono preferencial, se activa la asimilación de fuentes alternativas de carbono mediante la liberación de la represión catabólica. En este caso, los niveles de los ARN reguladores CrcZ y CrcY son

elevados y secuestran la proteína Hfq libre, impidiendo que lleve a cabo su función represora de la traducción de los ARNm diana (Hernández-Arranz et al., 2016).

#### 4.4.1.1. Efecto de Hfq/Crc sobre la expresión de *cbrA* y *cbrB*

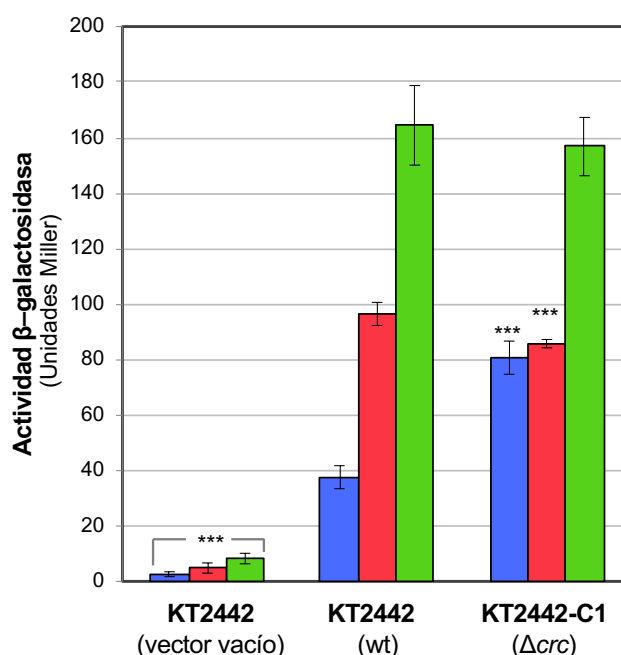
En un primer abordaje para determinar el efecto del complejo Hfq/Crc sobre los componentes principales del sistema Cbr, se procedió a examinar si la secuencia correspondiente al ARNm de *cbrA* y *cbrB* contenía secuencias de unión de Hfq/Crc (AAnAAnAA). Como se describió en el apartado 4.1.1 del capítulo 1, los genes *cbrA* y *cbrB* se localizan adyacentes en el genoma de *P. putida*, existiendo un solapamiento de la región promotora de *cbrB* con el extremo 3' de la secuencia codificante de *cbrA*. Aunque el inicio de transcripción de *cbrA* no ha sido identificado hasta la fecha, existe un sitio de unión de Hfq/Crc localizado a 203 pb aguas arriba del inicio de traducción de *cbrA* (Figura 57).



**Figura 57. Localización de posibles sitios de unión de Hfq/Crc en las regiones promotoras de *cbrA* y *cbrB*.** Contexto genómico de los genes *PP4694*, *cbrX* (PP5704, morado), *cbrA* (PP4695, verde) y *cbrB* (PP4696, amarillo) en *P. putida* KT2442. En la parte inferior aparecen las regiones intergénicas de *cbrA* (izquierda) y de *cbrB* (derecha). La región solapante entre *cbrX* y *cbrA* está sombreada en azul. La A en rojo corresponde al inicio de transcripción de *cbrB*, las secuencias subrayadas corresponden a las cajas conservadas -35 y -10 de unión del factor  $\sigma^{70}$ , el sitio de unión de Hfq/Crc predicho se indica recuadrado en azul y los codones de inicio y de stop se resaltan en negro.

Sin embargo, no se ha podido localizar este tipo de secuencia en la región UTR (*UnTranslated Region* del inglés) del mensajero aguas arriba del ATG de *cbrB*. Esto sugiere que el complejo Hfq/Crc no parece ejercer un control sobre la traducción de dicho gen.

Para demostrar el control de Hfq/Crc sobre la expresión de CbrA en distintas condiciones de disponibilidad de carbono, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión traduccional de *cbrA'*-*lacZ* (plásmido pMPO1370), en un fondo silvestre KT2442 y mutante  $\Delta$ *crc* (KT2442-C1) (Figura 58).



**Figura 58. Medida de la expresión *in vivo* de CbrA mediante fusión traduccional a *lacZ* en *P. putida* KT2442 y en el mutante  $\Delta$ *crc*.** Los niveles de expresión se estimaron como actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión traduccional de *cbrA'*-*lacZ* en el plásmido pMPO1370 (coord.+249) para los fondos silvestre (KT2442) y mutante  $\Delta$ *crc* (KT2442-C1). Los ensayos se realizaron en medio rico LB (barras azules) y medio mínimo con succinato (barras rojas) u oxalacetato (barras verdes) como fuentes de carbono. Como control se usó el plásmido vacío pMPO200. Los valores corresponden a las medias y las barras de error indican las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-valores obtenido de aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

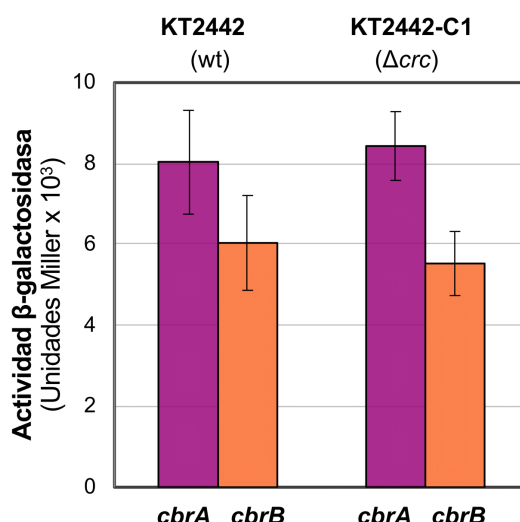
Como se muestra en la figura 58, la expresión de CbrA se vio modulada por la fuente de carbono presente. Para la estirpe silvestre, los niveles de CbrA más altos se obtuvieron en medio mínimo con OAA (condiciones desreprimidas), observándose una disminución de 1.7 veces, en succinato como fuente de carbono, y de 4.4 veces en LB, condición de máxima represión catabólica (Figura 58). La dependencia de la expresión de una histidina quinasa en función de la fuente de carbono, no había sido descrita hasta la fecha.

La cuantificación de la misma construcción en un fondo  $\Delta crc$  (KT2442-C1), no reflejó una variación significativa en un medio mínimo con Scc u OAA ya que son condiciones de desrepresión, en las que la cantidad de Hfq/Crc activa es menor a causa de los mayores niveles de CrcZ y CrcY que la secuestran (Figura 58). No obstante, el efecto observado en LB fue de 2.2 veces superior en comparación al fondo silvestre, alcanzando los niveles de desrepresión total. Estos resultados indican que Crc está reprimiendo la expresión de *cbrA* en las condiciones de máxima represión donde los niveles de los ARNm CrcZ y CrcY son bajos y, por tanto, la unión de Hfq/Crc al ARNm no está limitada.

Por otra parte, se analizó si el represor traduccional Crc ejercía algún efecto (probablemente indirecto al ser un represor traduccional) sobre la transcripción de *cbrA* y *cbrB*, únicamente en LB, la condición de máxima represión catabólica. Para ello, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de *cbrA* y *cbrB* al *lacZ*, en los plásmidos pMPO1357 y pMPO1319, respectivamente, en las estirpes silvestre (KT2442) y mutante  $\Delta crc$  (KT2442-C1) (Figura 59).

Como se aprecia en la figura 59, la falta de Crc no generó ninguna diferencia en los niveles transcripcionales de *cbrA* y *cbrB* en comparación con la estirpe silvestre, tal y como cabría esperar dada su naturaleza de represor traduccional. Al descartarse un efecto indirecto de Crc sobre la transcripción de *cbrA* y *cbrB*, se estableció que Hfq/Crc estaría regulando post-transcripcionalmente el ARNm de *cbrA*, hecho que se reafirma con el hallazgo de un sitio de unión de Hfq/Crc localizado a 203 pb del inicio de traducción de CbrA (Figura 57).



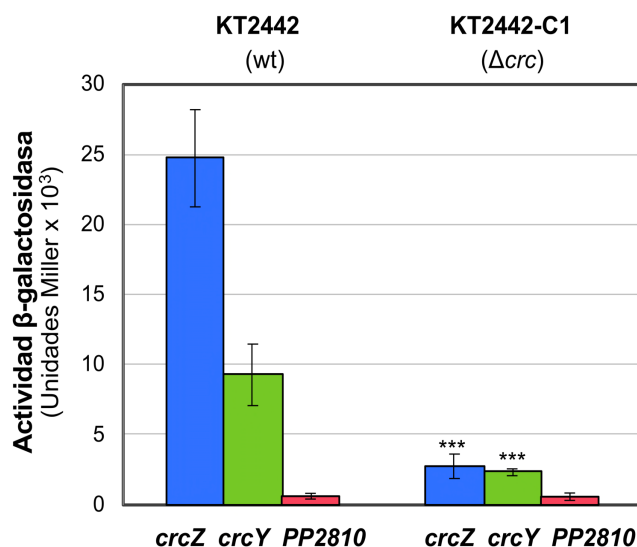


**Figura 59. Análisis *in vivo* de la expresión de *cbrA* y *cbrB* mediante fusiones transcripcionales a *lacZ* en *P. putida* KT2442 y en el mutante  $\Delta crc$ .** Los niveles de expresión se estimaron como actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión transcripcional de  $P_{cbrA}::lacZ$  en el plásmido pMPO1357 (barras rosas) y de  $P_{cbrB}::lacZ$  en el plásmido pMPO1319 (barras naranjas) para los fondos silvestre (KT2442) y mutante  $\Delta crc$  (KT2442-C1) cultivados en medio rico LB. Los valores corresponden a las medias y las barras de error indican las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-values obtenido de aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.005$ .

#### 4.4.1.2. Efecto de Crc en la expresión de *crcZ*, *crcY* y otras dianas del sistema Cbr

Para estudiar un eventual control de Crc, probablemente de forma indirecta, sobre la expresión de *crcZ* y *crcY*, se ensayaron las fusiones transcripcionales  $P_{crcZ}::lacZ$  (plásmido pMPO1316) y  $P_{crcY}::lacZ$  (plásmido pMPO1314), en los fondos silvestre y  $\Delta crc$ , en un medio rico LB donde la actividad de Crc es máxima. Estas construcciones contenían las regiones promotoras desde la posición +1 al gen *lacZ* dado que aguas abajo se localizaron sitios CA de posible unión a Hfq/Crc que secuestran al complejo.

Como se muestra en la figura 33, con estas construcciones, la expresión de *crcZ* resultó ser 3 veces más alta para *crcY* en la estirpe silvestre, como se había comprobado previamente (apartado 4.1.3.2.2. del capítulo 1). En el fondo  $\Delta crc$ , la expresión de *crcZ* se vió reducida 9 veces y la de *crcY* 4 veces, en comparación al silvestre (Figura 60), confirmando los datos previos de (García-Mauriño et al., 2013).



**Figura 60. Análisis *in vivo* de la expresión de *crcZ*, *crcY* y *PP2810* en *P. putida* KT2442 y en el fondo mutante  $\Delta$ *crc*.** Se muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones transcripcionales de  $P_{crcZ}::lacZ$  en el plásmido pMPO1316 (barras azules),  $P_{crcY}::lacZ$  en el plásmido pMPO1314 (barras verdes) y  $P_{PP2810}::lacZ$  en el plásmido pMPO420 (barras rojas) para los fondos silvestre (KT2442) y mutante  $\Delta$ *crc* (KT2442-C1) en medio rico LB. Los valores corresponden a las medias y las barras de error indican las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-values tras aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

El efecto positivo indirecto observado de Crc sobre CrcZ y CrcY podría ser explicado por la participación de uno o varios elementos adicionales que regulen negativamente la transcripción de estos ARNs reguladores. Una posible explicación sería que Hfq/Crc podía estar reprimiendo la expresión de un represor transcripcional de CrcZ (Corona et al., 2018; García-Mauriño et al., 2013). Para verificar la existencia de un regulador adicional desconocido que participe en la regulación en cascada de CrcZ y CrcY, se iniciará un abordaje experimental en el apartado 4.4.3.

Por último, este efecto no se observó en los niveles de expresión de otros genes diana de CbrB como *PP2810* al presentar unos niveles basales bastante bajos con respecto a *crcZ* y *crcY* (Figura 60). Este hecho dificultaría la detección de una clara dependencia de Crc al ser un gen que requiere más cantidad de CbrB~P para su activación.

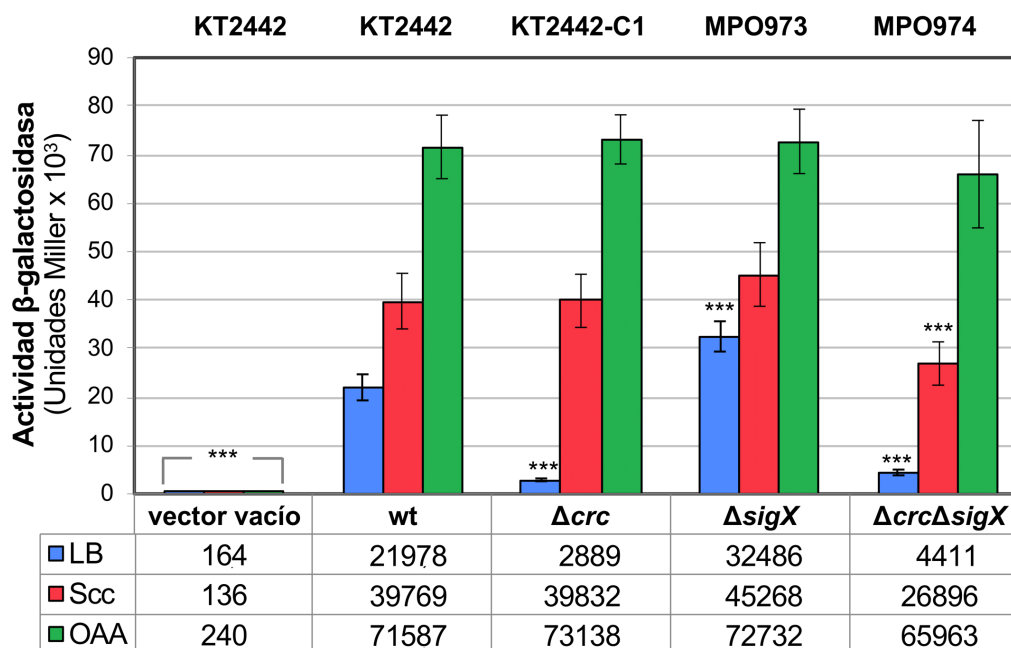
#### 4.4.2. Interacción con el factor sigma SigX

En apartados anteriores se ha demostrado que la ausencia del represor traduccional Crc conlleva una disminución considerable en los niveles de CrcZ y CrcY en un medio rico (condiciones de represión catabólica), pero a la vez son los pequeños ARNs los que regulan la actividad de Crc, generándose un bucle autorregulador en ese medio. Este fenómeno podría implicar la participación de un elemento regulador desconocido que actúe en una cascada de regulación más compleja y que lleve a cabo una retroregulación del sistema. Los factores sigma con función extracitoplásmica (ECFs)  $\sigma^{ECF}$ , son mecanismos de transducción de señales que en ocasiones interactúan con sistemas de dos componentes u otros sistemas de señalización (Chevalier et al., 2019). En *P. aeruginosa*, SigX desempeña un papel clave en la homeostasis de la fluidez de membrana ante un estrés de la pared celular. Además se ha descrito que un mutante  $\Delta sigX$  en *P. aeruginosa* PAO1 se encuentra desreprimido catabólicamente y presenta altos niveles de CrcZ (Fléhard et al., 2018), lo que sugiere una interconexión con el sistema regulador CbrAB. Por este motivo, procedimos a estudiar esta posible interacción en *P. putida* y, en primer lugar, se evaluaron los niveles de ARNm de algunas dianas de CbrAB.

##### 4.4.2.1. Estudio de la expresión de *crcZ* en los fondos genéticos $\Delta sigX$ y $\Delta crc \Delta sigX$

Basándonos en la evidencia del efecto indirecto de Crc sobre la expresión de *crcZ*, cabe esperar que la eliminación del supuesto represor de *crcZ*, controlado a su vez por Hfq/Crc, genere un efecto positivo mediante el incremento en la expresión del pequeño ARN. Para averiguar si en *P. putida* KT2442 se producía un efecto equivalente al evidenciado en *P. aeruginosa* PAO1, es decir, un incremento significativo en los niveles de CrcZ en LB en ausencia de SigX, se construyó un mutante de delección  $\Delta sigX$  (MPO973) mediante el sistema de edición de genomas bacterianos basado en la endonucleasa I-SceI (véase apartado 3.3.4. de materiales y métodos). Además, se construyó un mutante doble de delección  $\Delta crc \Delta sigX$  (MPO974) siguiendo el mismo procedimiento experimental que para el mutante simple, con el fin de determinar la participación de Crc y su supuesta posición en la cascada de regulación de SigX sobre CrcZ.

La cuantificación de los niveles de expresión de *crcZ* se llevó a cabo a través de ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::lacZ$  (plásmido pMPO1316) en los fondos genéticos KT2442, KT2442-C1 ( $\Delta crc$ ), MPO973 ( $\Delta sigX$ ) y MPO974 ( $\Delta crc \Delta sigX$ ) en LB, succinato y OAA (Figura 61).



**Figura 61. Niveles de expresión de *crcZ* en *P. putida* KT2442 y en los fondos  $\Delta$ *crc*,  $\Delta$ *sigX* y  $\Delta$ *crc* $\Delta$ *sigX*.** Medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::lacZ$  (pMPO1316) en las estirpes KT2442 (silvestre, wt), KT2442-C1 ( $\Delta$ *crc*), MPO973 ( $\Delta$ *sigX*), MPO974 ( $\Delta$ *crc* $\Delta$ *sigX*). Se monitorizó la actividad en medio LB (barras azules) y medio mínimo suplementado con succinato (barras rojas) u oxalacetato (barras verdes). El vector vacío pMPO234 se usó como control. Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-valores obtenidos tras aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

Como se representa en la figura 61, la expresión de *crcZ* se indujo 1.8 y 3.2 veces en succinato y OAA, respecto a LB en la estirpe silvestre KT2442. Asimismo, la reducción en LB de la expresión de *crcZ* en el fondo  $\Delta$ *crc* fue de aproximadamente 8 veces, como ya se había detectado previamente ((García-Mauriño et al., 2013), Figura 60). Por otro lado, la expresión de *crcZ* en LB en el fondo  $\Delta$ *sigX* (MPO973) aumentó 1.5 veces con respecto al silvestre en las mismas condiciones. Esta inducción sigue el patrón de expresión de *P. aeruginosa*, donde se ha visto que un mutante *sigX* se encuentra desreprimido catabólicamente (Fléchar et al., 2018), si bien la diferencia en *P. putida* es inferior. Aunque los niveles de CrcZ en el mutante  $\Delta$ *crc* $\Delta$ *sigX* (MPO974) son similares a los del mutante simple  $\Delta$ *crc* (KT2442-C1) en un medio no represor como MM con Scc u OAA, en LB se observa de nuevo un incremento de 1.5 veces sobre los niveles cuantificados en el mutante  $\Delta$ *crc*. Estos resultados sugieren que tanto Crc como SigX controlarían de algún modo la expresión de *crcZ* aunque *a priori* parecen no estar interconectados.

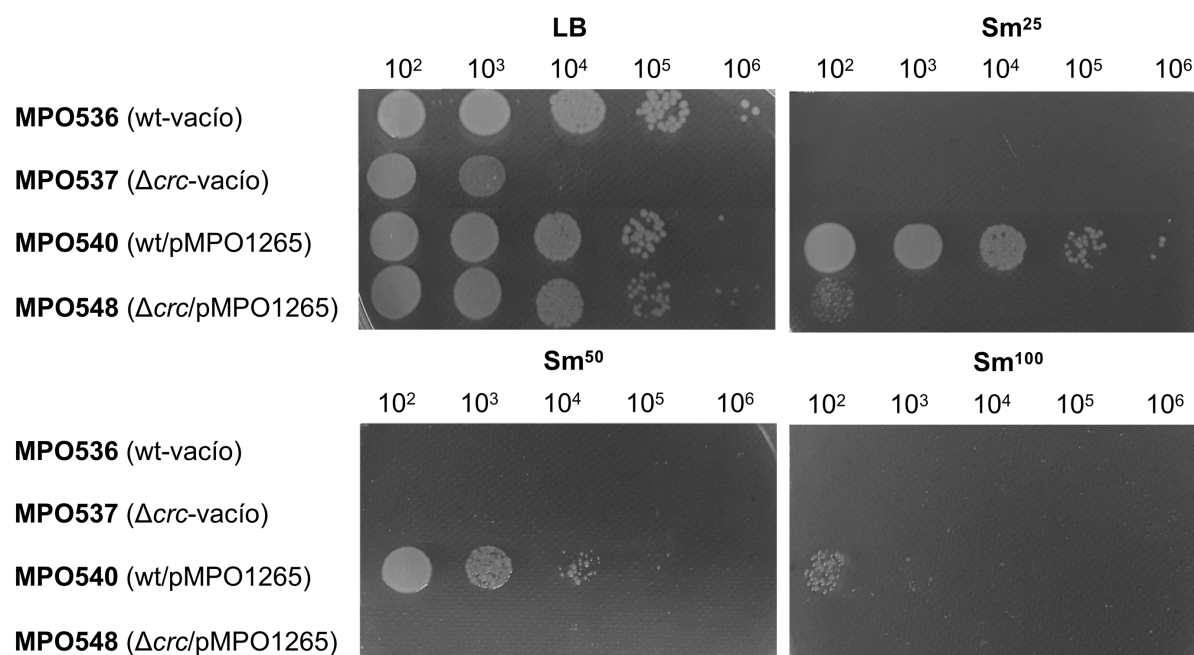
#### 4.4.3. Búsqueda de elementos reguladores adicionales que interaccionan con CbrAB

Con el fin de identificar un posible elemento regulador que ejerciese un control negativo sobre CrcZ y CrcY, a través de Crc, se hizo una mutagénesis por transposición sobre un fondo  $\Delta crc$ , seleccionando niveles altos de CrcZ (equivalentes a los de la estirpe silvestre) en medio LB. Para ello, se integró una fusión  $P_{crcZ}::Sm$  en el sitio Tn7 del mutante KT2442-C1 ( $\Delta crc$ ) desde el plásmido pMPO1265, y se seleccionaron mutantes de inserción resistentes a Sm, y por lo tanto, con altos niveles de *crcZ*.

Para poder estimar la concentración de estreptomicina necesaria para tener una selección limpia de los mutantes resistentes, se estimó en primer lugar la frecuencia de aparición de mutantes espontáneos al antibiótico en las estirpes silvestre, MPO536, y mutante  $\Delta crc$ , MPO537, sobre el que se llevará a cabo la mutagénesis (apartado 3.1.5.2 de materiales y métodos). La frecuencia de aparición de mutantes espontáneos a estreptomicina 50  $\mu\text{g/mL}$  fue de  $10^{-7}$  ufc/mL para ambas estirpes, que consideramos suficientemente baja como para elegir el gen *aadA* que codifica a estreptomicina 3''(9) O-nucleotidil transferasa, que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina (Fling et al., 1985), como marcador adecuado para la selección de mutantes resistentes por transposición. De este modo, se construyó una fusión transcripcional de la región promotora de *crcZ* al gen *aadA* ( $P_{crcZ}::aadA$ ) en el plásmido pMPO1265 (véase apartados 3.5.6 de materiales y métodos), que permite seleccionar indirectamente clones con altos niveles de expresión de CrcZ mediante la resistencia bacteriana a concentraciones de estreptomicina superiores a la MIC establecida para el mutante  $\Delta crc$ .

La electroporación del plásmido pMPO1265 a *P. putida* KT2442 y el mutante  $\Delta crc$  (KT2442-C1) para su inserción en el genoma en el sitio de Tn7 dio lugar a las estirpes MPO540 y MPO548, respectivamente. Como controles de expresión basal del plásmido se repitió el mismo procedimiento con el plásmido vacío, pMPO1379, generando las estirpes MPO536 y MPO537, respectivamente.

Para comprobar si la integración en el cromosoma de la fusión  $P_{crcZ}::aadA$  confería resistencia a estreptomicina, se hicieron diluciones en gota de las estirpes anteriores en LB y LB con concentraciones crecientes de Sm (25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 62).



**Figura 62. Resistencia a estreptomicina de las estirpes silvestre (MPO540) y mutante  $\Delta$ *crc* (MPO548) mediante ensayos de dilución en gota.** Las estirpes silvestre MPO540 y mutante  $\Delta$ *crc* MPO548 con la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::aadA$  se cultivaron en medio LB hasta una  $A_{600} = 0.3$ . Como controles se pusieron la estirpe silvestre MPO536 y el mutante  $\Delta$ *crc* MPO537 con el plásmido vacío pMPO1379 integrado en el sitio de Tn7. Tras llevar a cabo diluciones seriadas, se sembraron en gotas de 10  $\mu$ L en placas de LB en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del antibiótico estreptomicina (25, 50 y 100  $\mu$ g/mL), y se incubaron 30 °C durante toda la noche.

Como se observa en la figura 62, las estirpes MPO540 y MPO548, que contienen la fusión  $P_{crcZ}::aadA$  crecen mejor en el medio con estreptomicina que las estirpes que no tienen la fusión  $P_{crcZ}::aadA$  (MPO536 y MPO537), lo que demuestra que la resistencia adquirida a estreptomicina es a través de la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::aadA$  en el plásmido pMPO1265. Sin embargo, aun llevando la construcción  $P_{crcZ}::aadA$ , el mutante  $\Delta$ *crc* (MPO548) es más sensible que la estirpe silvestre, inhibiéndose su crecimiento a una concentración de 25 frente a 100  $\mu$ g/mL que resiste la estirpe silvestre MPO540. Podemos interpretar de estos datos, que la expresión de *crcZ* en el fondo silvestre es superior a la del fondo  $\Delta$ *crc*.

Una vez comprobada que la fusión  $P_{crcZ}::aadA$  confiere resistencia a estreptomicina y nos permite estimar los niveles de expresión de *CrcZ* en el fondo silvestre y mutante  $\Delta$ *crc* en LB, se realizaron dos mutagénesis por transposición empleando el transposón miniTn5-Km mediante siembra en placa a distintas concentraciones del antibiótico (véase apartado 3.3.5. de materiales y métodos). El escrutinio permitió estimar una frecuencia de transposición de  $1.7 \cdot 10^{-4}$  ufc/mL. Según el número de transpuestos obtenidos en la mutagénesis ( $5.1 \cdot 10^4$

ufc/mL), se estimó una cobertura de 8.5 veces el genoma de *P. putida* KT2442 de un tamaño de 6.18 Mb. A partir del número total de transpuestos ( $5.1 \cdot 10^4$  ufc/mL) y el número total de resistentes a Sm con el transposón ( $1.2 \cdot 10^3$  ufc/mL), se estimó una frecuencia de aparición de resistentes portadores del transposón miniTn5-Km de  $2.3 \cdot 10^{-2}$  ufc/mL, aproximadamente 4 órdenes por encima de la frecuencia de aparición de mutantes espontáneos a Sm.

Por otra parte, se obtuvieron diferentes frecuencias de resistentes en función del grado de resistencia a Sm de los mutantes. La frecuencia de resistentes para el rango de concentración de 25-50 µg/mL fue de  $3.9 \cdot 10^{-6}$  ufc/mL, para 100 µg/mL fue de  $5.1 \cdot 10^{-7}$  ufc/mL y para 200 µg/mL de estreptomicina fue de  $6.4 \cdot 10^{-8}$  ufc/mL.

Finalmente, se analizó un total de 76 mutantes que resistían concentraciones de Sm más altas que el mutante MPO548, y de ellos un total de 31 mutantes se seleccionaron para identificar el sitio de integración del transposón.

#### **4.4.3.1. Localización de las inserciones en la mutagénesis por transposición**

El primer paso a realizar con los mutantes preseleccionados durante el cribado por dilución en gota fue la identificación del gen o genes interrumpidos por el transposón miniTn5-Km. La amplificación y secuenciación de las regiones flanqueantes a las inserciones del transposón se hicieron siguiendo el método de PCR arbitraria descrita en el apartado 3.2.5. de materiales y métodos. Se identificaron inserciones en 22 genes diferentes de los 31 clones analizados.

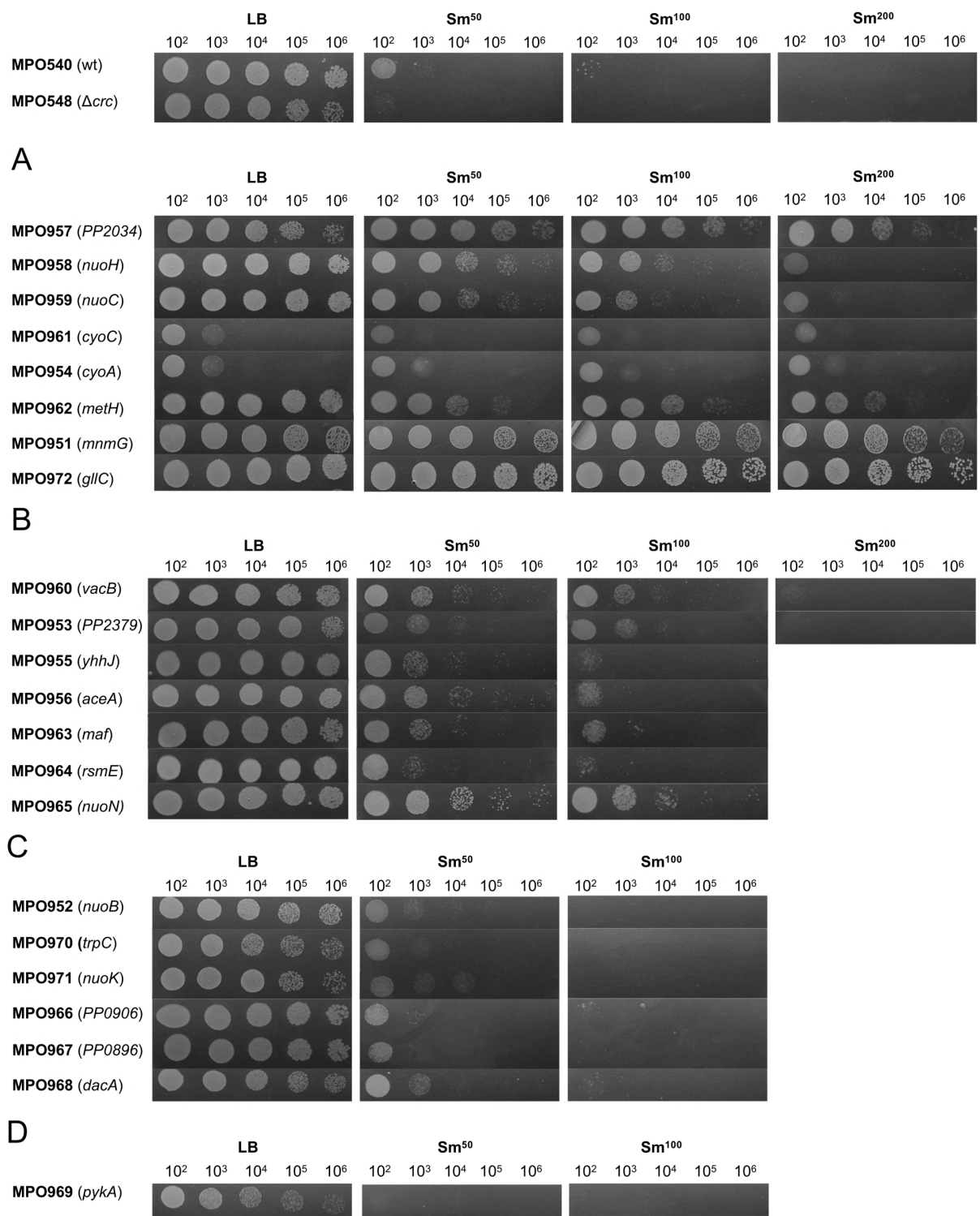
##### **4.4.3.1.1. Clasificación de los mutantes en función de la resistencia a estreptomicina**

La resistencia a estreptomicina era una medida indirecta de los niveles de expresión de *crcZ* que empleamos para identificar los mutantes supresores en el fenotipo de CrcZ. El mapeo del sitio de inserción del transposón miniTn5-Km dio como resultado estirpes con la interrupción de 22 genes distintos de un total de 31 mutantes secuenciados. Algunos mutantes de los que se prescindieron en futuros ensayos eran redundantes ya que contenían inserciones en el mismo gen.

Como primera aproximación, se procedió a clasificar los mutantes atendiendo al grado de supresión del fenotipo de modo que se analizó la tolerancia a estreptomicina de los 22



mutantes seleccionados mediante el método de dilución en gota (Figura 63), para validar el fenotipo de selección en la mutagénesis.





**Figura 63. Clasificación de los mutantes seleccionados en función de su resistencia a estreptomicina mediante ensayo de dilución en gota.** Las estirpes silvestre KT2442 (MPO540), mutante  $\Delta crc$  (MPO548) con la fusión  $P_{crcZ}::aadA$ , y los mutantes por transposición (MPO951-MPO972) fueron cultivados en medio LB hasta una  $A_{600} = 0.3$ , y sembrados mediante dilución seriada en gotas de 10  $\mu\text{L}$  en placas de LB en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del antibiótico estreptomicina (50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Mutantes resistentes a 200  $\mu\text{g/mL}$  (A), a 100  $\mu\text{g/mL}$  (B), a 50  $\mu\text{g/mL}$  (C) y por debajo de 50  $\mu\text{g/mL}$  (D). La imagen corresponde a un ensayo representativo de al menos tres réplicas biológicas realizadas.

Nuevamente, el organismo silvestre (MPO540) resistió concentraciones más elevadas que todas las estirpes  $\Delta crc$  en estudio, concretamente algunas colonias hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  suponiendo 4 veces por encima de la concentración de Sm a la que creció el mutante  $\Delta crc$  (MPO548). El crecimiento del mutante  $\Delta crc$  se inhibió a 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 63) y sólo fue capaz de resistir hasta 25  $\mu\text{g/mL}$ , significativamente inferior a la cepa silvestre tal y como se determinó con anterioridad (Figura 62). La diferencia tan amplia entre las concentraciones de Sm tolerables por la cepa silvestre y el mutante  $\Delta crc$  ofrece la oportunidad de obtener mutantes con diferentes grados de supresión del fenotipo lo que podría ayudar a identificar distintos elementos en la ruta de regulación de CrcZ.

La figura 63 muestra que todos los mutantes resisten concentraciones de Sm superiores a la tolerable por la estirpe  $\Delta crc$ , y por lo tanto deben presentar niveles de CrcZ más elevados. El cálculo de la máxima concentración a la que eran resistentes cada fondo genético permitió distinguir cuatro categorías de resistencia a Sm por encima de la estimada para el mutante  $\Delta crc$ , MPO548, (25  $\mu\text{g/mL}$ ): 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  y <50  $\mu\text{g/mL}$ .

De los 22 mutantes seleccionados en la mutagénesis dada su resistencia en un intervalo de 25-200  $\mu\text{g/mL}$  de Sm, la mayoría de ellos crecieron en un rango máximo de 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina (Figura 63 B y C). Esta concentración se encuentra por encima de los valores tolerables de la estirpe silvestre (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y mutante  $\Delta crc$  (25  $\mu\text{g/mL}$ ) y, por lo tanto, se confirman que están desreprimidos. Aquellos mutantes resistentes a concentraciones de Sm superiores al organismo silvestre podrían presentar genes interrumpidos implicados en otros procesos diferentes a la regulación de *crcZ* mientras que, los que más se aproximen al valor de la cepa silvestre, serían los candidatos que con mayor probabilidad intervengan en la ruta de regulación de CrcZ a través de Crc.

En la primera categoría se agruparon los mutantes MPO957 (*PP2034*), MPO958 (*nuoH*), MPO959 (*nuoC*), MPO961 (*cyoC*), MPO954 (*cyoA*), MPO962 (*metH*), MPO951 (*mnmG*) y MPO972 (*gllC*) cuyo crecimiento no fue inhibido a una concentración de Sm de 200  $\mu\text{g/mL}$ ,

significativamente superior a las cepas parentales, de modo que el valor de la MIC estimada posiblemente será superior a dicha concentración (Figura 63 A).

Próximos a la concentración de Sm en la que el organismo silvestre es resistente, entorno a 100 µg/mL, destacaron los mutantes MPO960 (*vacB*), MPO953 (*PP2379*), MPO955 (*yhhJ*), MPO956 (*aceA*), MPO963 (*maf*), MPO964 (*rsmE*) y MPO965 (*nuoN*) (Figura 63 B).

Con una resistencia a Sm de 50 µg/mL se obtuvieron las estirpes MPO952 (*nuoB*), MPO970 (*trpC*), MPO971 (*nuoK*), MPO966 (*PP0906*), MPO967 (*PP0896*) y MPO968 (*dacA*) (Figura 63 C).

Por último, sólo el mutante MPO969 (*pykA*) no creció a 50 µg/mL de estreptomicina mostrando una ligera supresión del fenotipo de la ausencia de Crc, aunque sin recuperar completamente el fenotipo silvestre (Figura 63 D).

#### 4.4.3.1.2. Clasificación funcional de los mutantes por transposición

Los 22 mutantes por transposición seleccionados se clasificaron además atendiendo a la función del gen interrumpido por el transposón. Las categorías fueron: transporte de electrones y cadena respiratoria, transporte de membrana, pared celular, metabolismo central, metabolismo de aminoácidos, degradación de compuestos orgánicos y procesamiento de ARN (Anexo I).

- a. Transporte de electrones y cadena respiratoria: Son aquellos mutantes que presentaron inserciones en los genes *nuo*, *cyo* o en *PP2379*. Los mutantes MPO952, MPO959, MPO958, MPO971 y MPO965 tenían inserciones del transposón en las posiciones 4656887, 4659316, 4664264, 4666056 y 4669731 del genoma de *P. putida* KT2442, respectivamente. Estas inserciones se localizaban dentro de los genes *nuoB* (PP4120), *nuoE* (PP4121), *nuoH* (PP4125), *nuoK* (PP4128) y *nuoN* (PP4131), que codifican a las subunidades B, E, H, K y N de la enzima NADH quinona oxidoreductasa. Se mapearon otros dos mutantes y presentaron de nuevo inserciones en el *nuoB* (posición 4656867) y en el gen *nuoH* (posición 4663958), respectivamente (Anexo I). El operón *nuoABCEFGHIJKLMN* codifica a uno de los componentes principales de la cadena respiratoria, la enzima NADH quinona oxidoreductasa también conocida como NADH deshidrogenasa. Homóloga al complejo I mitocondrial, se ha descrito que este complejo enzimático es responsable de la translocación de protones (H<sup>+</sup>) a través de la membrana acoplado al transporte de electrones obtenidos de la oxidación del cofactor NADH a NAD<sup>+</sup> (Efremov et al.,

2010; Schulte et al., 2014). Por otra parte, las inserciones en los mutantes MPO954 y MPO961 se localizaron en las posiciones 951035 y 953761 del genoma, dentro de los genes *cyoA* (PP0812) y *cyoC* (PP0814), que codifican a las subunidades II y III de la enzima citocromo *bo*<sub>3</sub> oxidasa (Anexo I). Ambos genes constituyen una unidad policistónica (*cyoABCDE*) junto a los genes *cyoB* y *cyoD*, que codifican a las subunidades I y IV del mismo complejo enzimático, y *cyoE*, que codifica a la enzima hemo O sintasa, esencial en establecer el núcleo catalítico (hemo O-cobre) para la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O en la cadena respiratoria (Arai, 2011; Ugidos et al., 2008). A diferencia de las estirpes anteriores, el mutante MPO953 presenta la inserción en la región intergénica entre los genes *nfuA* y *PP2379*, en la posición 2719590. El gen *PP2379* está anotado como proteína de la familia Sco1/SenC implicada en el ensamblaje del núcleo catalítico de la citocromo oxidasa terminal tipo *aa*<sub>3</sub> (Banci et al., 2011).

- b. Transportadores de membrana: Los mutantes MPO957, MPO955 y MPO966 presentaron inserciones en las posiciones 2312645, 5940677 y 1048321 ubicadas en los genes *PP2034*, *yhhJ* (PP5208) y *PP0906* que codifican a proteínas transportadoras tipo MSF, ABC o RND, respectivamente (Anexo I). Las proteínas tipo MSF representan el grupo más amplio de transportadores secundarios que transportan pequeñas sustancias a través de la membrana acoplado a un gradiente electroquímico (Kumar et al., 2013; Yan, 2015). Aunque normalmente los transportadores tipo ABC intervienen en la absorción nutricional en un proceso dependiente energéticamente, también están relacionados con la traducción de señales, secreción de proteínas, resistencia a antibióticos, esporulación y virulencia (Locher, 2009; Szakács et al., 2008). Los transportadores tipo RND son las principales bombas de extrusión con una gran especificidad de sustrato que exportan componentes tóxicos para la célula (Vargiu et al., 2016; Yamaguchi et al., 2015).
- c. Pared y división celular: En esta categoría se incluyeron mutantes en genes relacionados con la integridad de la pared celular. El mutante MPO968 presenta la inserción en la posición 5465701 que corresponde al gen *dacA* (PP4803), que codifica la enzima D-alanil D-alanina carboxipeptidasa, también conocida como proteína de unión a penicilina (PBP5) (Anexo I). Esta proteína desempeña un papel esencial en la biosíntesis de peptidoglicano (Ghosh et al., 2008; Yang et al., 2018). Por otra parte, la estirpe MPO963 contiene la inserción en la posición 1078603 en el gen *maf* (PP0936) cuyo producto génico comparte un 52 % de identidad con YhdE de *E. coli*, proteína participe en la detención de la división celular tras la formación del septum. En el genoma de *P. putida*, el gen *maf* está precedido por el operón

*mreBCD* asociado al mantenimiento de la forma bacilar, el establecimiento de la polaridad celular y la síntesis de la pared celular y, aguas abajo de *maf* se encuentra el gen *rng*, que codifica a la ribonucleasa RNasa E que regula a proteínas implicadas en la formación del septum y la división celular.

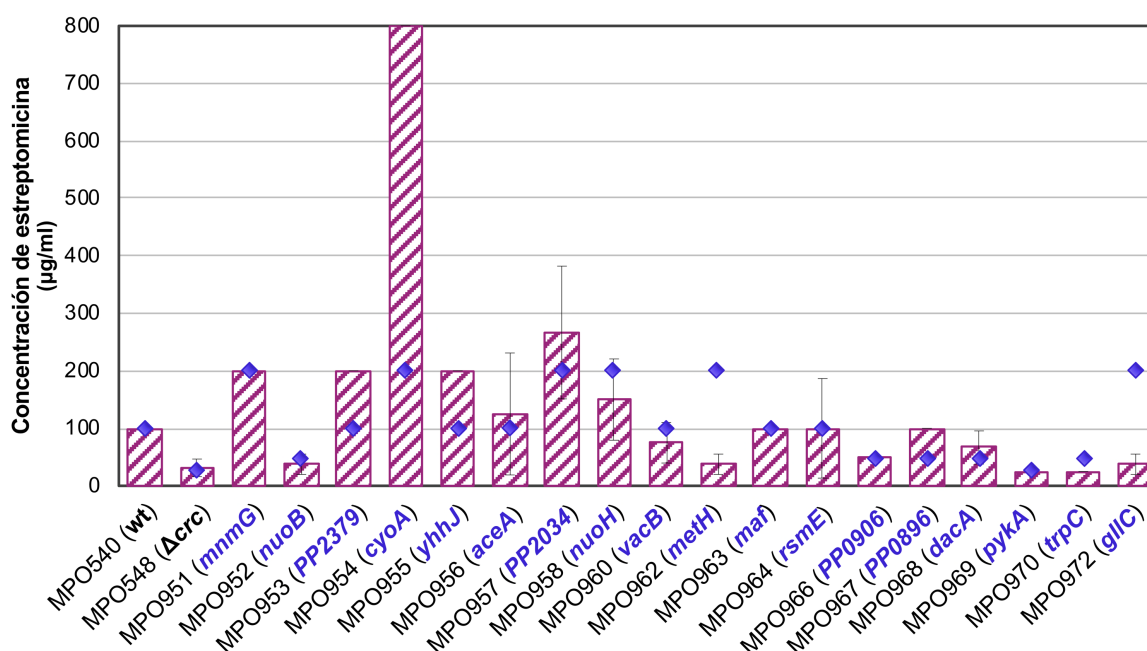
- d. Metabolismo central: Los mutantes MPO969 y MPO956 portan inserciones de miniTn5-Km en las posiciones 1551748 y en la posición 4653975 dentro de los genes *pykA* (PP1362) y *aceA* (PP4116), respectivamente (Anexo I). La enzima piruvato quinasa II (PYK), codificada por el gen *pykA*, participa en el metabolismo del piruvato mientras que la enzima isocitrato liasa (ICL), codificada por *aceA*, actúa en el primer paso de la reacción anaplerótica del ciclo del glioxilato.
- e. Metabolismo de aminoácidos: Los mutantes MPO970 y MPO962 contienen inserciones en los genes *trpC* (PP0422), en la posición 511358, y *metH* (PP2375), en la posición 2713404 del genoma (Anexo I). El operón *trpGDC* participa en la biosíntesis de triptófano donde la enzima indol 3-glicerol fosfato sintasa, producto del gen *trpC*, cataliza el penúltimo paso de dicha ruta. En cambio, la enzima metionina sintetasa dependiente de cobalamina, codificada por el gen *metH*, está involucrada en la síntesis de los aminoácidos azufrados metionina y cisteína.
- f. Catabolismo de compuestos orgánicos aromáticos y determinados compuestos nitrogenados: La estirpe MPO972 presenta interrumpido el gen *gIIc* (PP2514) en la posición 2861777 que codifica al ácido 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadípico aldolasa (CHA), enzima del catabolismo del ácido gálico. Por otra parte, el mutante MPO967 contiene la inserción de miniTn5-Km en el gen *PP0896*, concretamente en la posición 1037801 del genoma (Anexo I). En las bases de datos viene anotado como una proteína de la familia de las hidrolasas cuyo grupo de ortólogos, las nitrilasas, están destinadas a la reducción de compuestos nitrogenados y la producción de amoníaco.
- g. Procesamiento de ARN: Las estirpes MPO951, MPO960 y MPO964 contienen inserciones en los genes *mnmG* o *trmF* (PP0004) (posición 2608), *vacB* o *rnr* (PP4880) (posición 5547386) y *rsmE* (PP4985) (posición 5680436), respectivamente (Anexo I). Estos genes codifican actividades que permiten la adición de un grupo 5-carboximetilaminometilo (cmnm) a la uridina de la posición oscilante (*wobble position*) de ciertos ARNts por parte de la enzima GidA, la degradación directa de determinados ARNms llevada a cabo por la RNasa R y la mejora de la estabilidad de la estructura ribosómica por parte de la enzima ARNr 16S (uracilo<sup>1498</sup>-N<sup>3</sup>)-metiltransferasa, respectivamente.

#### **4.4.3.2. Caracterización fenotípica de los mutantes supresores por transposición**

El mapeo de los puntos de inserción del transposón miniTn5-Km en el genoma del mutante *crc* permitió seleccionar un total de 22 mutantes que manifestaban un fenotipo de resistencia a estreptomicina similar al organismo silvestre KT2442 sugiriendo una supresión del fenotipo de la delección de *crc* sobre la expresión de *CrcZ*. Partiendo de esta premisa, se procedió a una caracterización preliminar de dichos mutantes en los que se estimará la concentración mínima inhibitoria en medio líquido, se evaluará el estado energético y *redox* de cada mutante a través de la cuantificación de determinados cofactores indicativos y, por último, se comprobará la correlación del incremento en la resistencia al antibiótico estreptomicina con el aumento de la expresión de *CrcZ*.

##### **4.4.3.2.1. Estimación de la concentración mínima inhibitoria de los mutantes supresores**

El escrutinio de mutantes resistentes a estreptomicina por el método de dilución en gota permitió validar, de forma semi-cuantitativa, la selección durante la mutagénesis de las 22 estirpes seleccionados. Sin embargo, para estimar de forma más precisa la resistencia al antibiótico (e indirectamente la expresión de *crcZ*), se determinó de forma exacta la MIC de cultivo planctónico de los candidatos en placas multipocillos, según recomiendan los manuales de toxicología ((Wiegand et al., 2008), y apartado 3.1.5.1.2 de materiales y métodos). En los casos en los que hubiese polaridad de la inserción sobre los genes distales pertenecientes a un mismo operón, se ensayaron los mutantes con la inserción del transposón en genes ubicados en una posición aguas arriba de la misma unidad transcripcional. Además, se amplió el rango de concentraciones del antibiótico, abarcando desde 25 µg/mL a 1600 µg/mL.



**Figura 64. Determinación de la concentración mínima inhibitoria a estreptomicina de los mutantes seleccionados.** Las barras verticales representan el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) a estreptomicina para la estirpe silvestre *P. putida* KT2442 (MPO540), mutante  $\Delta crc$  (MPO548) y los diferentes mutantes por transposición (MPO951, MPO952, MPO953, MPO954, MPO955, MPO956, MPO957, MPO958, MPO960, MPO962, MPO963, MPO964, MPO966, MPO967, MPO968, MPO969, MPO970, MPO972). Los genes interrumpidos por el transposón miniTn5-Km se resaltan en azul. Los valores corresponden a las medias y las barras de error indican las desviaciones estándar de al menos dos ensayos independientes. Los rombos azules localizados sobre las barras verticales indican el valor de la concentración máxima de Sm a la que crecieron los mutantes, testada a través del método de dilución en gota.

Las estirpes silvestre MPO540 y mutante  $\Delta crc$  MPO548 no crecieron a concentraciones de Sm por encima de 100 µg/mL y 25 µg/mL, respectivamente, lo cual se corresponde con el ensayo previo de dilución en gota (Figuras 62, 63 y 64). Los valores de la MIC determinados por este método coincidieron en rango con los determinados por dilución en gota para seis de las estirpes ensayadas (Figura 64): MPO951 (*mnmG*) a 200 µg/mL, MPO952 (*nuoB*) a 50 µg/mL, MPO963 (*maf*) a 100 µg/mL, MPO964 (*rsmE*) a 100 µg/mL, MPO966 (*PP0906*) a 50 µg/mL y MPO969 (*pykA*) a 25 µg/mL.

En siete estirpes, el rango del valor de la MIC difirió sutilmente del valor estimado por el método de dilución en gota, probablemente a consecuencia del mayor efecto de difusión del agente antimicrobiano en el medio líquido. Estas estirpes fueron MPO953 (*PP2379*) y MPO955 (*yhhJ*) con un valor de MIC de 200 µg/mL, MPO956 (*aceA*) a ~125 µg/mL, MPO957

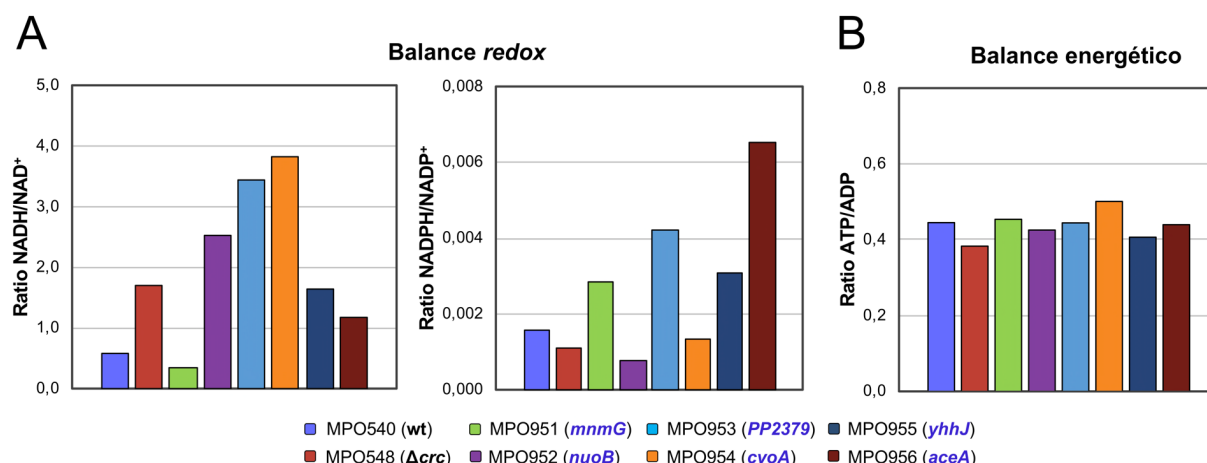
(PP2034) a ~300  $\mu\text{g/mL}$ , MPO967 (PP0896) a 100  $\mu\text{g/mL}$  y MPO968 (*dacA*) a 70  $\mu\text{g/mL}$ . Sorprendentemente, en la estirpe MPO954 (*cyoA*) la MIC superó en 4 veces la concentración máxima de Sm tolerable en medio sólido estimada por el método de dilución en gota, alcanzando un valor de 800  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 64).

Por otro lado, el valor de la MIC resultó ser inferior al determinado por el ensayo de dilución en gota para cinco de los transpuestos, MPO958 (*nuoH*) con una MIC de 150  $\mu\text{g/mL}$ , MPO960 (*vacB*) a 75  $\mu\text{g/mL}$ , MPO962 (*metH*) y MPO972 (*glcC*) a 37.5  $\mu\text{g/mL}$  y MPO970 (*trpC*) a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.4.3.2.2. Estudio del estado *redox* y energético de los mutantes supresores mediante HPLC

En los últimos años, diversos estudios han contribuido a describir determinadas características fenotípicas de un mutante deficiente en *Crc* como la susceptibilidad a estrés oxidativo y la alteración en los balances *redox* a nivel de los nucleótidos de piridina (Corona et al., 2019). El desequilibrio metabólico y el constante estrés oxidativo endógeno al que está sometido el mutante  $\Delta\text{crc}$  se evidencia con la modificación de la actividad enzimática de *Zwf* (glucosa 6-P deshidrogenasa) y *Edd/Edda* (6-fosfogluconato deshidratasa / 2-deshidro-3-desoxigluconato-6-P aldolasa), enzimas fuertemente reprimidas por *Crc* (Corona et al., 2018). La superproducción de estas enzimas influye en gran medida en la producción de NADPH, un cofactor esencial para los sistemas de desintoxicación involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo y procesos biosintéticos.

Otro modo de asociar un fenotipo al efecto de una doble mutación en el fondo  $\Delta\text{crc}$  como consecuencia de la inserción del transposón miniTn5-Km en los genes *mnmG*, *nuoB*, *PP2379*, *cyoA*, *yhhJ* y *aceA*, consistió en analizar el estado *redox* y energético en condiciones de represión catabólica. Se cuantificó la concentración de los distintos nucleótidos de piridina que participan en procesos de óxidorreducción como  $\text{NAD}^+$ , NADH,  $\text{NADP}^+$  y NADPH y los cofactores ATP y ADP mediante cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*) (véase apartado 3.9.1. de materiales y métodos). Estos seis mutantes se seleccionaron como representantes de categorías en las que *Crc* pudiera estar regulando determinados procesos biológicos como el estado energético celular a través de la cadena respiratoria y el transporte de electrones (mutantes MPO952 (*nuoB*), MPO953 (PP2379) y MPO954 (*cyoA*)), transporte de membrana (mutante MPO955 (*yhhJ*)), metabolismo central (mutante MPO956 (*aceA*)) y procesamiento de ARN (mutante MPO951 (*mnmG*)).



**Figura 65. Balances redox y energético de los mutantes resistentes a estreptomicina.** Los balances redox (A) y energético (B) se determinaron a partir de concentraciones intracelulares absolutas de los nucleótidos de piridina NADH y NAD<sup>+</sup> (izquierda), NADPH y NADP<sup>+</sup> (centro) y de los cofactores ATP y ADP (derecha). Todos los cofactores nucleotídicos se estimaron en cultivos en fase exponencial del organismo silvestre MPO540 (wt), mutante  $\Delta$ *crc* (MPO548) y los distintos mutantes resistentes a Sm MPO951, MPO952, MPO953, MPO954, MPO955 y MPO956. Los genes interrumpidos por el transposón miniTn5-Km se resaltan en azul.

Los resultados preliminares correspondientes a los balances redox NADH/NAD<sup>+</sup> y NADPH/NADP<sup>+</sup> y del balance energético (ATP/ADP) en la estirpe silvestre, mutante  $\Delta$ *crc* y mutantes resistentes a Sm se representan en la figura 65. La principal diferencia destacable es el incremento de 2.9 veces en la relación NADH/NAD<sup>+</sup> en un mutante carente de Crc con respecto a la cepa parental. Por el contrario, los valores de los cocientes NADPH/NADP<sup>+</sup> y ATP/ADP fueron similares entre la estirpe silvestre MPO540 y el mutante  $\Delta$ *crc*, MPO548.

Los balances NADH/NAD<sup>+</sup> calculados en los mutantes MPO952 (*nuoB*), MPO953 (*PP2379*) y MPO954 (*cyoA*), superaron 1.5, 2 y 2.3 veces, respectivamente, al de la cepa  $\Delta$ *crc*. Por el contrario, el valor registrado para el fondo MPO955 fue equivalente al mutante MPO548 mientras que los mutantes MPO951 (*mnmG*) y MPO956 (*aceA*) descendieron del orden de 5.1 y 1.4 veces, respectivamente. Cuando se analizaron los balances de los nucleótidos NADPH/NADP<sup>+</sup>, los valores obtenidos se mantuvieron similares en todas las estirpes estudiadas si tenemos en cuenta el rango de la escala.

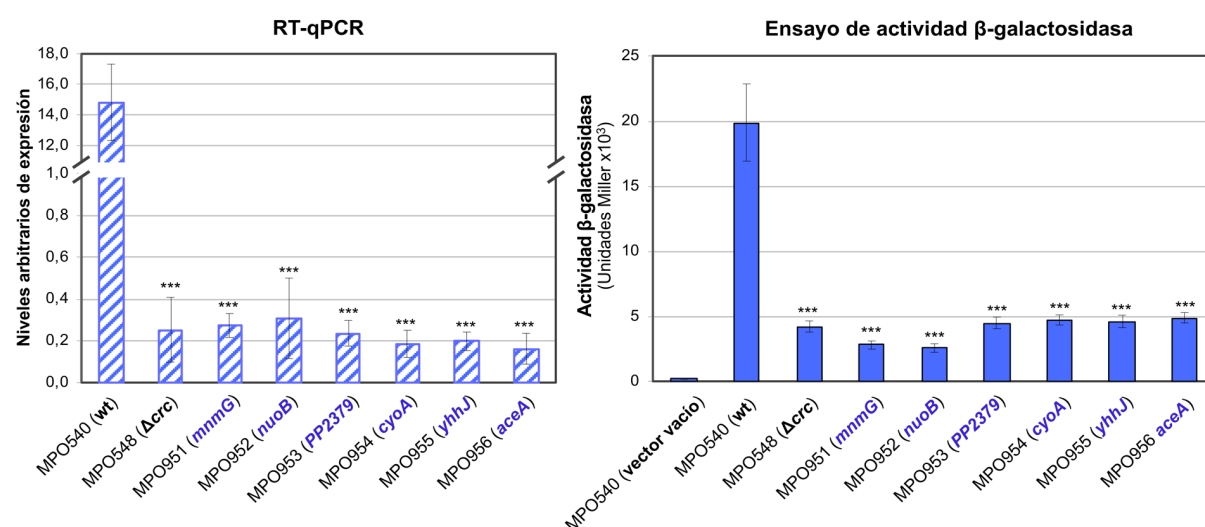
El contenido en energía estimado como la relación ATP/ADP no se vio alterado en ninguna de las estirpes oscilando sus valores entre 0.39 y 0.5. Esta ausencia de variación indicaría que las respectivas mutaciones en los genes *mnmG*, *nuoB*, *PP2379*, *cyoA*, *yhhJ* y *aceA* no interfieren en la capacidad de obtención de energía o bien, la bacteria reajusta los



flujos metabólicos sin que se modifique la cantidad de ATP intracelular. En cualquier caso, la ausencia de réplicas experimentales imposibilita obtener conclusiones claras y, por tanto, los datos aportados por este estudio deben considerarse muy preliminares.

#### 4.4.3.2.3. Medida de la expresión de *crcZ* en los mutantes supresores

El método indirecto de discernir variaciones en la expresión de CrcZ, como consecuencia de la supresión del efecto de la delección de *crc* sobre dicho ARN regulador, consistió en medir la tolerancia al antibiótico estreptomina mediante la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::aadA$  integrada en el genoma del mutante  $\Delta crc$ . Para comprobar la correlación entre el incremento de expresión de *crcZ* y el fenotipo de resistencia a Sm, se cuantificaron los niveles de *crcZ* mediante RT-qPCR y ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de represión catabólica (LB) (Figura 66).



**Figura 66. Medida de la expresión de *crcZ* en los mutantes resistentes a estreptomina.** La cuantificación de los niveles de expresión de *crcZ* en LB en la estirpe silvestre (MPO540, wt), mutante *crc*<sup>-</sup> (MPO548,  $\Delta crc$ ) y mutantes resistentes a Sm MPO951 (*mnmG*), MPO952 (*nuoB*), MPO953 (*PP2379*), MPO954 (*cyoA*), MPO955 (*yhhJ*) y MPO956 (*aceA*) se realizó mediante RT-qPCR (izquierda) y mediante ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa (derecha). Para el ensayo de RT-qPCR se empleó la pareja de oligonucleótidos *crcZ*49-1Q/ *crcZ*99-2Q y en el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa se utilizó la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::lacZ$  contenida en el plásmido pMPO1284. Como control en el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa se usó el plásmido vacío pMPO234. Los valores corresponden a las medias y las barras de error indican las desviaciones estándar de al menos tres ensayos independientes. Las estrellas representan los *p*-valores obtenido de aplicar el test de Student para muestras no pareadas que no suponen la misma varianza. \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.005.

La cuantificación de la cantidad de transcrito de *crcZ* total mediante RT-qPCR con los oligonucleótidos *crcZ*49-1Q y *crcZ*99-2Q, que hibridan en la región codificante de dicho gen, mostró una reducción de 59 veces en el fondo  $\Delta$ *crc* (MPO548) en comparación con el silvestre MPO540 (Figura 66), como se había descrito previamente (Figura 60, (García-Mauriño et al., 2013)). Sin embargo, y de forma sorprendente, la cuantificación del ARNm de *CrcZ* en todos los mutantes resistentes a estreptomicina (incluidos mutantes no mostrados en la figura 66), mostró niveles similarmente bajos de expresión que la estirpe parental  $\Delta$ *crc* (MPO548) sin incrementarse por encima de las  $5 \cdot 10^3$  Unidades Miller. La falta de concordancia en los resultados obtenidos, dado que estos mutantes resisten concentraciones elevadas de estreptomicina, y esperábamos altos niveles de expresión de *CrcZ*, nos llevó a ensayar los niveles mediante la actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión  $P_{crcZ}::lacZ$ , para descartar si la estabilidad del transcrito estuviera siendo comprometida por algún factor desconocido. De este modo, se conjugó a todos los fondos genéticos la fusión transcripcional  $P_{crcZ}::lacZ$  del plásmido pMPO1284 (equivalente a pMPO1316 excepto por el marcador de selección, véase apartado 3.4.6. de materiales y métodos). Los resultados aportados por este ensayo reprodujeron exactamente los patrones de expresión obtenidos por RT-qPCR. Esto confirma que la capacidad de estos mutantes para resistir al antibiótico estreptomicina, no está relacionada con los niveles altos de *CrcZ*. La inserción del transposón, por lo tanto, no parece tener que ver con una interferencia con el mecanismo regulador mediado por CbrB, *Crc* o *CrcZ/CrcY*, sino con una alteración funcional que tenga como consecuencia un nivel incrementado de resistencia a estreptomicina.

## DISCUSIÓN



El sistema CbrAB es exclusivo de algunos géneros de la familia *Pseudomonaceae* (*Pseudomonas* y *Azotobacter*) en los que se encuentra altamente conservado, y constituye un sistema de control global del metabolismo bacteriano que integra, no sólo la asimilación jerárquica de diversas fuentes de carbono, sino también la regulación de otros procesos complejos que le permiten a la bacteria una rápida adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Además el sistema CbrAB actúa de forma coordinada con otros sistemas reguladores como el sistema de control por nitrógeno NtrBC, en la asimilación de algunos aminoácidos como arginina, histidina y prolina (Amador et al., 2010; Li & Lu, 2007; Nishijyo et al., 2001; Zhang et al., 2015; Zhang & Rainey, 2008). Por último, también controla la actividad del sistema de represión catabólica a través del complejo Hfq/Crc (La Rosa et al., 2015; Quiroz-Rocha et al., 2017a; Sonnleitner et al., 2012). Todo esto indica que se encuentra formando parte de una gran cascada regulatoria que controla un abundante y diverso número de procesos metabólicos, y que, con toda probabilidad, lo hace en un punto elevado de esa jerarquía reguladora, confiriendo un efecto muy pleiotrópico en la fisiología de la bacteria.

El mecanismo de regulación transcripcional del TCS CbrAB ha sido caracterizado en profundidad en nuestro y otros laboratorios mediante abordajes –ómicos o bien moleculares sobre ciertas dianas en particular, como *crcZ*, *crcY* y *PP2810* (Abdou et al., 2011; Amador et al., 2010, 2016; Barroso et al., 2018; García-Mauriño et al., 2013; La Rosa et al., 2016; Sonnleitner et al., 2009; Valentini et al., 2014). Sin embargo, se tiene muy limitada información sobre el papel de la histidina quinasa CbrA en la recepción y transmisión de la posible señal inductora del sistema, que no ha sido identificada hasta la fecha. La organización estructural de CbrA supone además una característica peculiar entre las proteínas sensoras de los TCS, ya que posee un dominio que actúa como transportador de membrana físicamente vinculado a los dominios PAS y autoquinasa de la proteína, lo que la convierte en un novedoso e interesante grupo de HK (Korycinski et al., 2015; Sepulveda & Lupas, 2017).

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el control de la expresión génica de *cbrA*, el papel de sus dominios en la detección de la señal y la activación del sistema Cbr y su interconexión con otros sistemas de regulación.

### 5.1. El acoplamiento traduccional de *cbrX* sobre *cbrA-cbrB*

En este trabajo se ha localizado e identificado la pauta abierta de lectura *cbrX*, que se encuentra aguas arriba del locus *cbrA-cbrB*, y que codifica un pequeño péptido de 58 aminoácidos. El análisis comparativo de las secuencias entre diferentes especies de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* ha mostrado una alta conservación evolutiva de CbrX,

por lo que se le presupone una función biológica. A pesar de la elevada similitud de secuencia no se han encontrado en otros sistemas parálogos con función definida que pudieran aportar indicios sobre la función específica del péptido.

Los genes *cbrX* y *cbrA* se cotranscriben en una misma unidad transcripcional en la que *cbrX* dirige la traducción de CbrA mediante un mecanismo de acoplamiento traduccional (Figuras 27 y 39). El acoplamiento traduccional implica una dependencia de la eficiencia de la traducción de genes adyacentes que estén codificados en un ARNm policistrónico, de modo que la traducción de un gen distal depende de la traducción previa del gen situado inmediatamente aguas arriba (McCarthy & Gualerzi, 1990). Este mecanismo se ha descrito, por ejemplo, en procesos que han evolucionado hacia el mantenimiento de una correcta estequiometría entre los productos génicos correspondientes, como es el caso del operón *nifLA* que regula la fijación de nitrógeno en *Klebsiella pneumoniae*. El acoplamiento traduccional de dicho operón garantiza una estequiometría 1:1 de las dos proteínas reguladoras gracias a un mecanismo de reiniciación (*Termination-Reiniciation*) en el que los ribosomas destinados a traducir *nifL* reinician la traducción en la región de inicio de traducción de *nifA* (Govantes et al., 1998, 1996). En tales casos, se inhibe la traducción independiente del gen distal, siendo la traducción del gen proximal la que libera dicha inhibición. Se ha descrito que el acoplamiento traduccional controla procesos de diversa naturaleza como la expresión de operones metabólicos (Govantes et al., 1998; Little et al., 1989; Oppenheim & Yanofsky, 1980; Rex et al., 1994; Schumperli et al., 1982), genes que codifican proteínas ribosómicas (Baughman & Nomura, 1983) o genes reguladores (Dubyska, 2019), procesos de quimiotaxis (Løvdok et al., 2009) o la expresión del sensor EnvZ del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR (Liljestrom et al., 1988), que podría ser equivalente a CbrA.

En bacterias, por lo general, el inicio de la traducción de genes pertenecientes un ARNm policistrónico, tiene lugar de manera independiente, y la eficiencia del proceso depende de la región de iniciación de la traducción (TIR, *Translational Initiation Region* en inglés) (Huber et al., 2019; Quax et al., 2013). En algunos sistemas, la TIR de un gen aguas abajo está contenida y ocluida en una estructura secundaria en el ARNm, que se libera tras la traducción del gen distal. En otros casos, los bajos niveles de traducción independiente del gen proximal son consecuencia de una TIR poco conservada en secuencia. En el caso de *cbrA*, su secuencia *Shine-Dalgarno* se aleja de la secuencia consenso (Figura 25) y además está ocluida en una estructura secundaria (Figura 28). El hecho de que un péptido CbrX con la secuencia Nt intacta, pero con secuencia aguas abajo diferente (mutación -1+1 en pMPO1259) produzca niveles elevados de CbrA, al estar acoplado traduccionalmente en el

extremo Ct, confirma que no es la función del péptido resultante de la traducción sino su traducción *per se* lo que permite la traducción de *cbrA* (Figura 39).

Tanto *crcZ* como *crcY* se inducen rápidamente en condiciones represoras (LB), presentando niveles basales relativamente altos (Figura 34 A y B), en comparación con *PP2810* que se encuentra reprimido en esas condiciones (Figura 34 C), y se activa de forma gradual a medida que las fuentes de carbono son menos represoras. Esto indica que *PP2810* requiere cantidades de CbrB activo (fosforilado) más altas para su completa activación transcripcional. La alta capacidad de discriminación de la fuente de carbono de *PP2810*, supone una ventaja para el estudio de procesos donde sea necesario detectar cambios sutiles en la actividad de CbrAB. No obstante, y salvando estas diferencias cuantitativas, el patrón de activación en cuanto a la jerarquía de inducción en función de la fuente de carbono, fue equivalente para los tres genes diana, *crcZ*, *crcY* y *PP2810*.

Por otro lado, aunque el acoplamiento traduccional de *cbrX* y *cbrA* resuelve la obstrucción de la *Shine-Dalgarno* de *cbrA* y permite la reiniciación de la traducción, se observa que las diferentes mutaciones en la secuencia de *cbrX* que reducen la expresión de *cbrA* no alteran la activación mediada por el sistema Cbr, medida como expresión de *crcZ* (Figura 41). Esto parece indicar que los niveles basales de CbrA fosforilado son suficientes para fosforilar a CbrB, y promover así una activación eficiente de al menos aquellos genes diana que precisen poca cantidad de CbrB activo, como es el caso de *crcZ*.

## 5.2. El papel de CbrAB en la fisiología de *Pseudomonas*

El sistema CbrAB fue inicialmente descrito en *P. aeruginosa* como un sistema de regulación de la asimilación de distintos aminoácidos como fuente de carbono y/o nitrógeno (Moreno et al., 2009a; Rojo, 2010; Valentini et al., 2014). En distintas especies de *Pseudomonas*, la delección de *cbrA* o *cbrB* generó estirpes con un marcado fenotipo de deficiencia en el crecimiento en determinadas fuentes de carbono (como arginina, histidina, prolina y citrato) y otros fenotipos no relacionados como tolerancia a estrés, resistencia a antibióticos o metales pesados, o quimiotaxis (Amador et al., 2010; Filiatrault et al., 2013; Li & Lu, 2007; Nishijyo et al., 2001; Yeung et al., 2011; Zhang & Rainey, 2008). Además, se ha descrito que la utilización de histidina, que puede ser utilizado como fuente de carbono o de nitrógeno en función de la presencia de otros nutrientes, está sometida a un control dual por parte de los sistemas CbrAB y NtrBC (Amador et al., 2010, 2016; Zhang & Rainey, 2008).

En los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*, el proceso de represión catabólica mediado por el complejo Hfq/Crc es quien controla la asimilación de distintas fuentes de

carbono en función de su disponibilidad en el medio (Corona et al., 2018; La Rosa et al., 2016; Martínez-Valenzuela et al., 2018; Moreno et al., 2015; Quiroz-Rocha et al., 2017b; Rojo, 2010; Sonnleitner & Bläsi, 2014; Sonnleitner et al., 2012). Este proceso facilita una asimilación jerárquica de diversas fuentes de carbono priorizando aquellas que aportan un crecimiento eficiente y reprimiendo el catabolismo de otras fuentes de carbono que son energéticamente desfavorables (Görke & Stülke, 2008). A diferencia de otras bacterias como *E. coli* o *B. subtilis*, el succinato es una fuente de carbono represora en *P. putida* (la más represora después de LB) (Hester, et al., 2000a, b; Valentini et al., 2014) que le permite crecer casi tan rápidamente como en un medio rico (Figura 32). Dado que la actividad de Crc está directamente controlada a través de la cantidad de ARNs reguladores (CrcZ/CrcY), podemos inferir que la actividad del TCS CbrAB es quien en gran manera dirige el proceso de represión catabólica en la bacteria.

En *P. putida*, la delección del locus *cbrX-cbrA* generó un mutante con severas deficiencias en el crecimiento en medio mínimo suplementado con diversas fuentes de carbono (succinato, citrato, histidina y glucosa), siendo incapaz de utilizar citrato e histidina como fuentes de carbono. Por otra parte, la complementación del mutante  $\Delta cbrXA$  con una copia silvestre en el locus original del cromosoma restableció la capacidad de asimilar estas fuentes de carbono. Es de destacar que este marcado fenotipo es equivalente al comportamiento descrito en un mutante  $\Delta cbrB$ , por lo que es probable que ésta sea la única vía de asimilación.

En el desarrollo de esta Tesis, se ha analizado también la participación de CbrA en otros procesos con fenotipos descritos para un mutante  $\Delta cbrB$ , como la movilidad por *swimming* donde el flagelo constituye el principal órgano de propulsión. *P. putida* experimenta una eficiente adaptación quimiotáctica en la colonización de diversos nichos ecológicos gracias a la versátil modificación de su metabolismo y fisiología. La movilidad le garantiza el acceso a los nutrientes, evita la presencia de compuestos tóxicos y le permite dispersarse en el medio ambiente. La movilidad por *swimming* de un mutante  $\Delta cbrXA$  se encuentra reducida en un grado similar al observado para un mutante  $\Delta cbrB$  (Figura 36), donde la presencia de flagelos abundantes y aparentemente funcionales descartó que pudiera deberse a la limitación de los mismos (Amador et al., 2010). Hay que tener en cuenta que la alteración en la movilidad bacteriana podría relacionarse directamente con la carencia de los genes *cbrA* y *cbrB*, pero teniendo en cuenta que los mutantes Cbr están afectados en el consumo de algunos nutrientes, su defecto podría alterar indirectamente la quimiotaxis, ya que se establece un gradiente de concentración de los nutrientes del medio conforme la bacteria los va consumiendo, más que la movilidad *per se*. Este estímulo derivado del consumo



desencadenaría una respuesta quimiotáctica regulada por una cascada de fosforilación que ha sido ampliamente caracterizada en *E. coli* y *S. typhimurium*. En estos organismos, los nutrientes del medio son detectados por quimiorreceptores de membrana (MPCs) que a su vez modulan la actividad de la HK CheA a través de la vinculación con CheW y, por consiguiente, la fosfotransferencia al RR CheY que se une al motor flagelar provocando un cambio en la dirección del *swimming* hacia zonas con abundancia de nutrientes (Hazelbauer et al., 2008; Parkinson et al., 2015; Wadhams & Armitage, 2004).

En cualquier caso, estudios de transcriptómica comparativa entre un mutante deficiente en *cbrB*, el mutante  $\Delta ntrC$  y el correspondiente doble mutante, mostraron una expresión diferencial de genes que codifican a proteínas involucradas en quimiotaxis (McpH (PP\_0320), McpG (PP\_1371) y la proteína con dominio CheW (PP\_4333)) y otras en formación de *biofilm* como adhesinas (LapF), proteínas de exportación de exopolisacáridos (PP3126 y PP3128) y proteínas con dominios GGDEF (PP3932) (Amador et al., 2010). Estos resultados sugieren que existe un *cross-talk* entre los TCS CbrAB y/o NtrBC con otros sistemas de transducción de señales que participen en quimiotaxis. Un claro ejemplo es el defecto en la movilidad por *swimming* que manifiesta el mutante  $\Delta cbrB$  (Amador et al., 2010, 2016), relacionado con la principal ruta quimiosensorial, la ruta Che1, que controla la quimiotaxis en *P. putida* (García-Fontana et al., 2013).

En la alternancia de estilo de vida planctónico a sésil interviene el di-GMPc, un segundo mensajero intracelular, sintetizado por enzimas con dominios GGDEF como los RRs WspR o CfcR (Matilla et al., 2011; Ramos-González et al., 2016). El di-GMPc controla la síntesis de flagelo y de componentes de la matriz extracelular por medio de elementos como el RR FleQ (Hickman & Harwood, 2008) o PelD (Whitney et al., 2012) en una compleja red reguladora en *P. aeruginosa* (Balasubramanian et al., 2013). En *P. putida*, el fenotipo alterado de movilidad del mutante  $\Delta cbrB$ , a pesar de la apariencia funcional de sus flagelos, se ha asociado a una posible interferencia del TCS CbrAB en la cascada de señalización de la ruta quimiosensorial Che1 o bien, en aquellos mecanismos que modulan la concentración intracelular de di-GMPc de modo que modifique la función del motor flagelar (Amador et al., 2010).

Aunque se desconozca el mecanismo subyacente que conecta el sistema Cbr con la movilidad flagelar, es evidente que la falta de *cbrXA* imita el fenotipo del mutante  $\Delta cbrB$ . Dado que los niveles de ARNm de *cbrB* cuantificados por RT-qPCR no se modificaron en un fondo  $\Delta cbrXA$  (datos no mostrados), estos resultados muestran que al menos este proceso requiere de CbrA como histidina quinasa para desencadenar la activación de CbrB sin que exista una comunicación cruzada con ninguna de las otras 59 supuestas HKs codificadas en el genoma de *P. putida* KT2442.

### 5.3. El circuito de retroregulación del sistema CbrAB

La expresión de un sistema de dos componentes debe tener un cierto nivel basal constitutivo, que le permita al organismo mantener una cantidad suficiente de proteína sensora para detectar un estímulo específico, y de regulador de respuesta para iniciar una respuesta. Como la respuesta generada de un TCS es la cantidad de regulador fosforilado, el control de genes a menudo usa mecanismos de retroalimentación para ajustar de forma coordinada sus respuestas de salida y permitir una eficiente adaptación de la bacteria a fluctuaciones del medio ambiente (Groisman, 2016). Una retroregulación positiva o negativa controla la cantidad de regulador de respuesta o modifica la capacidad de un sensor u otras proteínas para alterar la fosforilación del RR, evitando así una descompensación de la dosis de HK y RR que origine efectos deletéreos en el huésped. El TCS PhoQP es un paradigma de autorregulación positiva muy conocido en enterobacterias donde el número de RR fosforilado (PhoP~P) aumenta a medida que el RR promueve su propia transcripción, generando de este modo sustratos adicionales para que sean fosforilados por la HK PhoQ. En un principio, PhoP fosforilado se une a promotores con sitios de unión de alta afinidad y conforme aumenta la concentración de PhoP~P se une a sitios de baja afinidad estableciéndose una jerarquía de expresión del regulón que puede reflejar varias respuestas fisiológicas (Groisman, 2001, 2016; Shin et al., 2006).

En este trabajo se ha estudiado la posible autorregulación de CbrA y el posible control sobre el estado de fosforilación de su RR afín, CbrB. *cbrB* se transcribe en la misma unidad transcripcional que *cbrA*, pero su expresión también está controlada por un promotor interno localizado en el extremo 3' de la secuencia codificante de *cbrA* (Amador et al., 2016; Nishijyo et al., 2001). En esta Tesis se ha demostrado por primera vez, que los niveles de una HK, CbrA, están regulados en función de la presencia de diferentes fuentes de carbono, y son inversamente proporcionales a la disponibilidad de carbono en el medio, siendo más altos cuando la fuente de carbono apenas se asimila o no se asimila. Sin embargo, los niveles de CbrA no están autorregulados, ni controlados por CbrB y, por tanto, son independientes del estado de fosforilación de CbrB, ya que permanecen inalterados en los fondos mutantes  $\Delta cbrB$  y  $\Delta cbrXA$  (Figura 42). Sin embargo, sí se ha detectado una secuencia de unión potencial del complejo Hfq/Crc (AAUAAUAA) en la secuencia líder (5'UTR) del ARNm de *cbrX-cbrA*, localizado 20 nucleótidos aguas abajo de la caja -10 TATA (Figura 25 y 57). Esto indica que podría haber una regulación post-transcripcional ejercida por Hfq/Crc sobre CbrX y CbrA. El análisis de la cantidad de CbrA en un medio represor en un fondo  $\Delta crc$ , corroboró esta hipótesis, y demostró un efecto negativo sobre la expresión de la HK (Figura 58). Aunque en estas condiciones el complejo Hfq/Crc pudiera estar interaccionando directamente con el

ARNm de *cbrXA* (aún no demostrado experimentalmente), este suceso no explicaría el fenotipo de expresión disminuida de *crcZ* y *crcY* en ausencia de Crc (Figura 60). Por tanto, suponemos la intervención de algún elemento regulador adicional aún desconocido que esté controlando el estado de fosforilación de CbrB y, como consecuencia, la expresión de los ARNs reguladores CrcZ y CrcY (ver más adelante).

Por otro lado, la coincidencia de fenotipos entre los mutantes  $\Delta cbrXA$  y  $\Delta cbrB$  en *P. putida* sugiere que la activación de CbrB *in vivo* es dependiente de la fosforilación por CbrA. La expresión de *cbrB* tiene lugar mayoritariamente desde su propio promotor y ésta no depende de *cbrXA* (datos no mostrados). No obstante, existen evidencias que indican que CbrB podría estar autorregulando negativamente su propia síntesis (Amador et al., 2010). A diferencia de CbrA, la mutación en *crc* no ejerció ningún efecto sobre los niveles transcripcionales ni traduccionales de *cbrB* (Figura 59, (García-Mauriño, 2014)) lo cual indica que su expresión no está sujeta al control post-transcripcional del complejo Hfq/Crc.

Con los resultados obtenidos en esta Tesis, parece evidente que los niveles de fosforilación de CbrA son críticos para mantener unos niveles basales de expresión de la cascada regulatoria. En la subfamilia de reguladores de respuesta NtrC, a la que pertenece CbrB, la fosforilación del RR no es imprescindible para la unión al ADN, sin embargo, se ha demostrado que estimula su oligomerización, que es fundamental en la activación de la transcripción de su regulón (Austin & Dixon, 1992; Du et al., 1998; Hervás et al., 2010; Lee et al., 2000; Ninfa et al., 1993; Weiss et al., 1991). Algunos genes pertenecientes al regulón de CbrB, como *crcZ*, se activan rápidamente *in vivo* con bajos niveles de CbrB~P (y hasta un 40 % de activación transcripcional *in vitro* con la forma desfosforilada), es decir, requieren poca activación del sistema Cbr para alcanzar altos niveles de expresión. En otros como *PP2810*, sin embargo, requieren condiciones limitantes de nutrientes más estrictas para activarse, y los niveles de expresión en un medio represor son muy bajos (Barroso et al., 2018). De este modo, la concentración y el estado de fosforilación del RR son aspectos claves para la activación del sistema.

#### **5.4. El solapamiento de sistemas reguladores y su efecto en la discriminación por fuente de carbono**

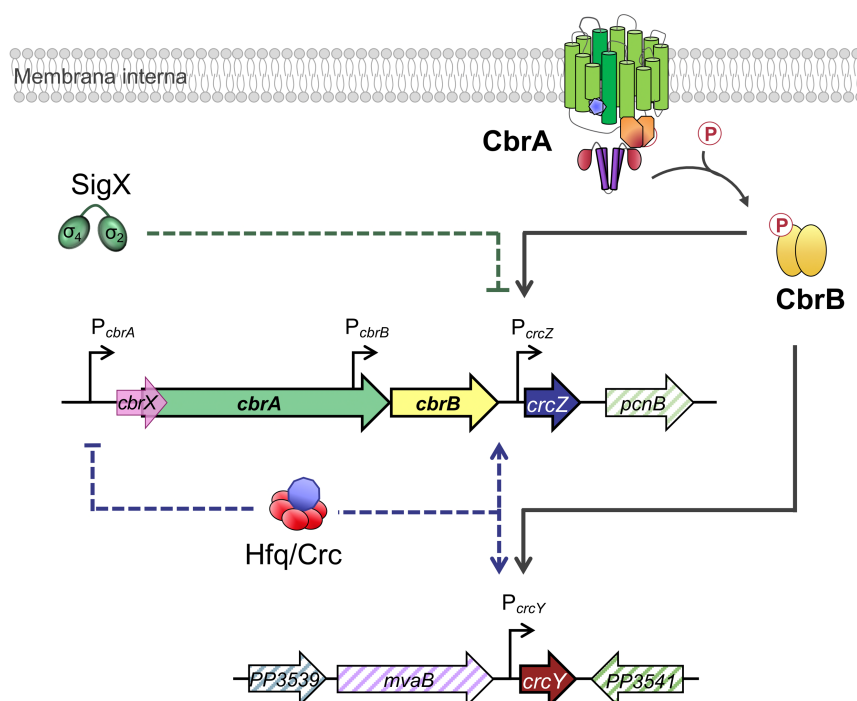
Aunque CbrAB se describió inicialmente como un TCS autónomo que controlaba la asimilación de distintos aminoácidos como fuente de carbono y/o nitrógeno en algunas *Pseudomonas* (Nishijyo et al., 2001), en los últimos tiempos se ha revelado la interacción con muchos otros sistemas reguladores, como NtrBC (Amador et al., 2010; Zhang & Rainey,

2008), Hfq/Crc (Moreno et al., 2012; Moreno et al., 2009a; Sonnleitner et al., 2009, 2012; Sonnleitner & Bläsi, 2014) o el factor  $\sigma^{\text{ECF}}$  SigX (Duchesne et al., 2018). Datos previos en nuestro y otros laboratorios, así como en esta Tesis, mostraron una interconexión entre el sistema Hfq/Crc y el sistema CbrAB. La implicación de los ARNs reguladores CrcZ y CrcY en la actividad de Hfq/Crc, mediante el secuestro del regulador traduccional Hfq que les impide la represión de la traducción de sus ARNm diana está bien caracterizada (Hernández-Arranz et al., 2016; Moreno et al., 2012; Sonnleitner & Bläsi, 2014). Sin embargo, en *P. putida* y *P. aeruginosa* también existe una regulación positiva de Crc sobre la expresión de CrcZ y CrcY (Corona, 2016; García-Mauriño et al., 2013). Crc coopera en la estabilización de la unión de Hfq a sus ARNm dianas formando un complejo proteico (Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al., 2018) y, dada su naturaleza de represor traduccional es altamente improbable que el complejo Hfq/Crc actúe directamente sobre los ARNm de *crcZ* y *crcY*. Estos datos apoyan la hipótesis de que la ausencia de Hfq/Crc impide la función de CbrB posiblemente interfiriendo en las señales fisiológicas que conduzcan a la fosforilación de CbrB. Por tanto, la intervención de un elemento regulador adicional, específicamente un represor, cuya síntesis esté regulada negativamente por Hfq/Crc, demostraría la vinculación funcional entre los ARNs CrcZ y CrcY y dicho complejo regulador (Figura 60). Existen antecedentes en los que se desarrolló un abordaje experimental con tal propósito, pero sin obtener resultados concluyentes (Corona, 2016), lo que nos condujo a diseñar un sistema de selección positiva mediante la búsqueda de niveles altos de CrcZ en un mutante  $\Delta\text{crc}$  estimados indirectamente con un marcador de resistencia a estreptomicina.

El análisis de los candidatos con niveles altos de CrcZ en un fondo  $\Delta\text{crc}$ , por mutagénesis por transposición, reveló que no era posible identificar ninguna diana que no estuviera relacionada con un mecanismo intrínseco de resistencia a estreptomicina, a pesar de que la mutagénesis fue saturante. Las fluctuaciones en el metabolismo bacteriano pueden modificar la susceptibilidad a los antibióticos (Martínez & Rojo, 2011) tal y como sucede con la enzima triosa fosfato isomerasa, TpiA, esencial en el metabolismo del carbono y relacionada con el proceso de virulencia y la resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*, principalmente a través de CrcZ (Xia et al., 2020). De este modo, las mutaciones por transposición podrían haber desencadenado diferentes sistemas de respuesta a estrés para tolerar concentraciones superiores a Sm. Algunos de los genes identificados en la mutagénesis, como el operón *nuoABCEFGHIJKLMN*, han sido descritos como dianas responsables de la resistencia a aminoglucósidos al reducir la fuerza protón motriz necesaria en el transporte activo del antibiótico al interior celular (Allison et al., 2011; Guest et al., 2017), mientras que otros, se han asociado a los mecanismos canónicos de resistencia a aminoglucósidos como la alteración en la cadena respiratoria, en la permeabilidad de

membrana o modificación de la diana del antibiótico (Martínez & Rojo, 2011; Poole, 2005; Taber et al., 1987). Por tanto, estos resultados apoyan la idea de que es posible que no exista un factor adicional que medie la regulación de Hfq/Crc sobre la expresión de CrcZ y CrcY tal y como ya apuntaban ciertos autores (Corona, 2016).

Por último, se analizó la posible implicación de SigX en la cascada regulatoria sobre CrcZ, dado que un mutante  $\Delta sigX$  presentaba niveles elevados de CrcZ en *P. aeruginosa* en un medio represor. El análisis en *P. putida* mostró que los niveles también eran consistentemente superiores en comparación con la estirpe silvestre, aunque el aumento fue de solo 1.5 veces. El hecho de que la expresión en un doble mutante  $\Delta crc \Delta sigX$  fuera equivalente a la expresión en el mutante simple  $\Delta crc$  (Figura 61), sugiere que el circuito regulador Hfq/Crc es dominante sobre la regulación de SigX, situándose en un nivel más elevado en la jerarquía regulatoria aunque actuando quizás paralelamente (Figura 67). Si el efecto de SigX sobre *crcZ* fuera directo, sería a través de un promotor distinto al que activa *cbrB*. En cualquier caso, es improbable que un factor  $\sigma^{ECF}$  regule negativamente un gen y, por lo tanto, el efecto detectado sobre la expresión de *crcZ* podría atribuirse a un efecto indirecto.



**Figura 67. Modelo de regulación del sistema CbrAB en *P. putida*.** Representación esquemática del circuito de regulación de la HK CbrA y el RR CbrB. CbrA se autofosforila tras la recepción de la señal y transfiere el grupo fosforilo a CbrB, que controla la expresión de *crcZ* y *crcY*. Por otra parte, el represor traduccional Hfq/Crc ejerce una regulación positiva probablemente indirecta sobre *crcZ* y *crcY* y una regulación negativa directa sobre *cbrA*. Además, el factor  $\sigma^{ECF}$  SigX controla negativamente la expresión de *crcZ* probablemente de forma indirecta.

### 5.5. Las peculiaridades estructurales de CbrA: Transporte y señalización en una misma molécula

CbrA se encuentra englobada, junto a CbrS, dentro de una familia única de histidina quinasas sensoras, que contienen un gran dominio transmembrana con similitud a transportadores de solutos (SLC5), unido al dominio catalítico HK, que contiene el residuo de histidina fosforilable (Sepulveda & Lupas, 2017). En el caso de CbrA, sus 13 dominios transmembrana presentan una elevada similitud con la proteína simportadora de Na<sup>+</sup>/prolina PutP. Los cotransportadores de Na<sup>+</sup>/solutos como vSGLT en *Vibrio parahaemolyticus* o PutP en *E. coli* son prototipos de transportadores activos secundarios que aprovechan la energía almacenada en gradientes electroquímicos para impulsar la acumulación de solutos específicos en la célula (H. Jung et al., 2012; Watanabe et al., 2010). La arquitectura modular de CbrA podría indicar que el proceso de señalización está vinculado al transporte de una molécula dentro de la misma proteína (Sepulveda & Lupas, 2017) y, por tanto, estas quinasas constituirían un único grupo de HK transmembrana que acoplarían la recepción del estímulo sensorial durante el transporte (Mascher et al., 2006).

Tradicionalmente, las HKs de membrana y los transportadores han compartido funciones relacionadas con la asimilación de nutrientes similares pero distintivas entre sí. Mientras que las primeras informan a la célula de las condiciones nutricionales del medio, los segundos transportan los nutrientes del exterior al interior celular como ocurre con las proteínas DctA y DctB en la captación de dicarboxilatos C<sub>4</sub> (Steinmetz et al., 2014) o el sistema PstSABC y PhoR en la absorción de fosfato inorgánico (Hsieh & Wanner, 2010; Muda et al., 1992; Västermark & Saier, 2014). En todos los casos, la coordinación es fundamental para garantizar que la expresión de los transportadores se induzca específicamente por las condiciones nutricionales del entorno. Posiblemente, la convergencia de ambas funciones en una única proteína se deba a un evento evolutivo en el que el estímulo desencadene la activación de la HK (Tetsch & Jung, 2009a, b; Thevelein & Voordeckers, 2009). En organismos eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae* ciertos receptores de glucosa (como Snf3p o Rgt2p) o de aminoácidos (como Ssy1p) que han perdido gran parte de su función como transportador, recuerdan al mecanismo de detección de este tipo de HK (Gancedo, 2008; B. Wu et al., 2006). Por otra parte, la proteína de membrana UhpC en *E. coli* es capaz de sensar y transportar glucosa 6P pero, hasta ahora, no hay evidencias que ambas funciones estén acopladas (Västermark & Saier, 2014).

El mecanismo mediante el cual CbrA detecta y comunica la información desde el exterior celular sigue sin estar definido hoy en día. Zhang y col. han mostrado que en *P. fluorescens* CbrA no sólo detecta histidina, sino que también es capaz de internalizarla, incluso cuando se

eliminan todos sus transportadores específicos (HutT<sub>u</sub>, HutT<sub>h</sub> y HutXWV), mediante un proceso dependiente de la señalización. Además, mostraron que el acoplamiento físico entre los dominios TM y el extremo C-terminal era necesario para su función y, por tanto, el transporte de histidina a través de los dominios TM desencadenaba una señal que activa el sistema CbrAB (Zhang et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado en *P. putida*, que el transporte de L-histidina a través del dominio SLC5 en CbrA no está acoplado a un gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> sino probablemente a un gradiente de H<sup>+</sup> (Wirtz et al., 2020). Esto puede ser debido a la falta de conservación en CbrA de ciertos aminoácidos del dominio TM de unión de Na<sup>+</sup> (Ser340 y Thr341) de PutP (Hilger et al., 2008).

Con la construcción de las variantes de CbrA de *P. putida* que carecían de los dominios TM o el dominio PAS, en este trabajo se ha tratado de caracterizar la implicación de cada uno de ellos en la actividad de CbrA, y su capacidad de activar los genes diana del sistema (en particular, el gen *PP2810* que es más sensible a pequeños cambios en la actividad Cbr). La delección de los dominios TM generó una proteína citoplásmica, mientras que la delección del dominio PAS generó una proteína anclada a membrana en la que, si la señal fuese externa, los dominios TM podrían detectarla. La sobreexpresión de la variante CbrA-ΔTM permitió detectar un 30 % de activación de PP2810, que demostraba que, aunque deslocalizada en el citoplasma, la proteína era capaz de percibir la señal de limitación de carbono y conservaba la capacidad de fosforilar a CbrB para activar el gen, si se suministraba en dosis lo suficientemente elevada (Figura 44). Los dominios TM de CbrA, por lo tanto, no resultaron esenciales para la actividad HK de CbrA, si bien no se podía descartar un papel modulador de la actividad. La proteína CbrA-ΔPAS, sin embargo, no fue capaz de activar la expresión de *PP2810* en ninguna de las condiciones ensayadas, bien porque el dominio es esencial para la percepción de la señal activadora, o bien porque la delección en fase del dominio PAS ocasionaba un plegamiento inapropiado, que hacía la proteína truncada inactiva o rápidamente degradada.

Nuestros resultados han sido posteriormente validados por los trabajos de Wirtz y colaboradores en *P. putida*, en los que mostraron que una versión equivalente a CbrA-ΔTM (CbrA-ΔSLC5; iniciada en el aa 504 de CbrA), conservaba parcialmente su actividad autoquinasa y su capacidad de transferir el grupo fosforilo a CbrB independientemente del transporte de L-his (Wirtz et al., 2020). Además, demostraron que, aunque tanto el dominio PAS como los TM eran capaces de interaccionar con la histidina, ésta no alteraba la capacidad auto- o trans- quinasa, por lo que ésta no debe ser el metabolito inductor del sistema, que queda aún por identificar. En cuanto a la capacidad para activar el sistema, los autores cuantificaron la inducción de *crcZ*, y comprobaron que tanto la versión CbrA-ΔTM como CbrA-

$\Delta$ PAS era capaces de restaurar la actividad de CbrA casi en su totalidad. Teniendo en cuenta que la expresión de *crcZ* tiene un nivel basal elevado y que se induce rápidamente con una dosis baja de CbrB~P (nuestros resultados), creemos que la medida de los niveles de PP2810 es un método mucho más adecuado para cuantificar la activación del sistema. Los resultados del grupo alemán parecen indicar una activación total del sistema, mientras que los nuestros muestran una activación parcial como consecuencia de la deslocalización de la proteína. En una u otra circunstancia, ambas aproximaciones muestran que los dominios TM no son necesarios para detectar o transportar la señal activadora del sistema, y que probablemente la procedencia de la misma sea intracelular.

La principal discrepancia que muestran Wirtz y colaboradores con nuestro trabajo es la activación de *crcZ* con la variante de CbrA que carece del dominio PAS. Teniendo en cuenta que la delección de la proteína para el grupo alemán comprendía los residuos 631 a 737, y la nuestra comprendía los residuos 627 a 703 (manteniendo el dominio STAC intacto), y que nosotros estudiamos la activación de una diana de expresión más baja (*PP2810*), los datos no son extrapolables y habría que hacer un estudio más minucioso para inferir conclusiones sobre el papel del dominio PAS en la actividad de CbrA. En nuestras manos, la activación del sistema incluso en condiciones de sobreexpresión de CbrA- $\Delta$ PAS, no es significativa, por lo que le asignamos un papel determinante en la detección de la molécula efectora mas que en en la fosforilación.

Por otra parte, la delección de los dominios TM de CbrA supuso una merma de la capacidad de asimilar la histidina (y citrato), aunque si la versión truncada se administraba en una dosis lo suficientemente alta (expresión dependiente de  $P_{tac}$ ), se recuperaba la capacidad de utilizarla como fuente de carbono (Figura 45 D). Esto pone de manifiesto que en *P. putida* el transporte de este aminoácido se debe realizar mayoritariamente usando transportadores alternativos a CbrA. La construcción de una HK quimera por intercambio de dominios ha permitido caracterizar estructural y funcionalmente las histidina quinasas de este grupo en *P. fluorescens*. La construcción de una HK quimera de CbrA-CrbS ha permitido demostrar también que el transporte del sustrato no es necesario para la transducción de señales (Sepulveda & Lupas, 2017). El sistema CrbS/R es un sistema de transducción de señal de dos componentes que regula la utilización de acetato en *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa* y *P. entomophila* (Hang et al., 2014; Jacob et al., 2017) en el que la proteína sensora CrbS tiene una disposición estructural similar a CbrA, donde un dominio SLC5 está vinculado al dominio HK del sensor (Sepulveda & Lupas, 2017). Sin embargo, difiere estructuralmente de CbrA en la presencia de un dominio REC en su extremo C-terminal. Los autores muestran que una quimera que contiene el dominio PAS-HisKA de CbrA y los 13 dominios TM de CrbS



recuperaba la capacidad de crecer en histidina en comparación con un mutante doble de delección  $\Delta cbrA\Delta crbS$ , demostrando de esta manera la actividad catalítica del dominio PAS-HK de CbrA. No obstante, la eficiencia de la inducción de Cbr no se cuantificó (Sepulveda & Lupas, 2017). La fusión de un dominio SLC5 transmembrana con un dominio autoquinasa en proteínas de transducción de señales como CbrA o CrbS puede desempeñar un papel en la detección temprana de una señal que desencadena la respuesta cuando hay suficiente proteína activa en el medio. En estos casos, parece más plausible que la señal se detecte intracelularmente desde el dominio PAS mediante la interacción con un metabolito específico o una proporción de metabolitos como en otras HK que detectan balances de C:N, al igual que se describió previamente utilizando un enfoque metabolómico para CbrB (Valentini et al., 2014). No obstante, esta hipótesis no descarta un papel modulador o de otro tipo adicional de los dominios SLC5 TM en la detección de la señal.

Experimentos de localización revelaron que CbrA- $\Delta$ TM se acumula en el citosol como consecuencia de la pérdida de anclaje a la membrana interna en ausencia de los dominios TM (Figura 47). Esta nueva localización de CbrA- $\Delta$ TM explicaría al menos parcialmente la limitada activación de los genes diana por una acumulación reducida de esta proteína en comparación con la silvestre. No obstante, cuando la sobreproducción de la proteína soluble (CbrA- $\Delta$ TM) condujo a su acumulación a niveles suficientemente altos, fue posible detectar su actividad mediante la activación transcripcional de *PP2810* que a su vez depende de la disponibilidad de carbono. Las imágenes de microscopía confocal presentadas en esta Tesis, contribuyeron a confirmar que los dominios TM de CbrA son los responsables de su anclaje en membrana al observarse su posicionamiento en el perímetro de la bacteria y también la redistribución de la proteína soluble en el citosol (Figura 48). A pesar de que el incremento en la producción de CbrA- $\Delta$ TM favoreciera la activación parcial del sistema Cbr, no mejoró sustancialmente la visualización por microscopía confocal ya que quizás un exceso de producción diera lugar a la formación de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, esta proteína soluble es capaz de percibir la señal, que debe ser intracelular, y responder a ella, probablemente a través de su dominio PAS.

## 5.6. La naturaleza de la señal activadora del sistema CbrAB en *P. putida*

La mayoría de los procesos de transducción de señales comienzan con la interacción entre el dominio sensor de una proteína y una molécula que actúa como estímulo sensorial. La escasez de información sobre los estímulos que desencadenan respuestas biológicas a través de la activación de los TCS establece un estrecho cuello de botella que complica la

comprensión de los circuitos reguladores (Krell, 2015). Por tanto, la identificación del estímulo exige de un profundo abordaje ya que la activación de un TCS puede requerir no sólo de la interacción proteína-ligando sino la convergencia de circunstancias específicas para tal propósito, como la combinación con otras moléculas (Henry & Crosson, 2011; Key et al., 2007a) e incluso la interacción con proteínas accesorias (Baraquet et al., 2006; Fernández et al., 2019; Neiditch et al., 2006).

La histidina quinasa CbrA pertenece a un TCS que, al igual que otros sistemas completamente caracterizados, se desconoce la naturaleza de la señal que promueve su activación. Hasta la fecha, la cristalización de la estructura de CbrA y de HKs con su atípica arquitectura modular no se ha realizado. Como se ha discutido previamente, el estímulo que activa CbrA tiene una procedencia intracelular, y se realiza con toda probabilidad mediante interacción con el dominio PAS. Los dominios PAS perciben una amplia variedad de señales que pueden unirse a una cavidad específica (LBD) y en algunos casos, se precisa de un cofactor o la asociación con proteínas accesorias para sensor un estímulo. En cualquier caso, una percepción periplásmica o la interacción con proteínas periplásmicas como ocurre entre LuxP y la HK LuxQ (Neiditch et al., 2006) es poco probable dada la localización citoplásmica predicha del dominio PAS de CbrA en *P. putida*.

Las condiciones de activación de un TCS pueden aportar indicios sobre la naturaleza de la señal responsable de su inducción. Algunos intermediarios del ciclo de Krebs y determinados aminoácidos establecen un patrón de expresión gradual de los principales componentes del sistema Cbr y de ciertos genes de su regulón. La histidina y el glutamato son aminoácidos que vinculan el metabolismo del carbono con el metabolismo del nitrógeno y también están estrechamente relacionados con el ciclo de Krebs y el metabolismo central. Sin embargo, en las condiciones más favorables de estabilidad de la proteína soluble, CbrA- $\Delta$ TM, los ensayos de DSF no mostraron un aumento en su termoestabilidad con la exposición a glutamato e histidina (Figura 54), dos de las moléculas candidatas a ser activadoras según los datos previos del laboratorio, en los que una de las mayores diferencias en metabolitos detectadas en condiciones de máxima inducción del sistema correspondía a estas moléculas (Valentini et al., 2014). Por tanto, la acumulación de glutamato durante las condiciones de máxima expresión del sistema Cbr (medio mínimo con oxalacetato), no parece ser la causa de la activación de CbrA (Figura 54). Recientemente, se ha evidenciado que CbrA interacciona con L-histidina no sólo a través del dominio SLC5 con el cual la internaliza, sino además con el dominio PAS (Wirtz et al., 2020). Aunque CbrA se uniera específicamente a L-his, algunos autores han sugerido que su unión no promueve la actividad autoquinasa de CbrA ni la

fosfotransferencia hacia CbrB (Wirtz et al., 2020) lo que apoya nuestra hipótesis de un metabolito central que actúe como molécula de señalización intracelular.

La analogía estructural del dominio PAS de CbrA con el dominio del fotosensor PYP (Rajagopal & Moffat, 2003) sugirió que la señal podría exhibir una estructura molecular similar al ácido *p*-cumárico, aunque este ligando concretamente no proporcionó una mejora significativa en la termoestabilidad de CbrA- $\Delta$ TM (Figura 55). El ácido *p*-cumárico es un compuesto aromático cuya estructura molecular recuerda a la de los aminoácidos L-trp y L-tyr y el cofactor NADPH con los que la estabilidad de la proteína se vio favorecida en el ensayo por DSF (Figura 54 y 56). Además del L-trp, es interesante destacar que la D-(+)-glucosa 6P y el NADPH, estrechamente relacionados con el metabolismo energético central, resultaron ser aquellos metabolitos con la mejor correlación entre el incremento de la termoestabilidad proteica y la dosis de ligando (Figura 56). La D-(+)-glu 6P es un efector alostérico frecuente en numerosas enzimas, entre ellas la glucógeno sintasa (Baskaran et al., 2010) o la ADP-glucosa pirofosforilasa (Asencion Diez et al., 2012), pero también es el único ligando que promueve la absorción de una amplia gama de azúcares fosforilados en *E. coli* a través del sistema UhpABC (Schwoppe et al., 2003; Verhamme et al., 2002). *P. putida* KT2440 durante su crecimiento reajusta dinámicamente sus flujos metabólicos en respuesta a la disponibilidad de nutrientes en el medio. El agotamiento de las fuentes de carbono preferenciales obliga a adoptar un metabolismo oxidativo más activo que es compensado con niveles elevados de NADPH para reducir los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Durante este proceso, el ciclo de Krebs modifica su configuración anaplerótica a oxidativa y la bacteria obtendría energía del catabolismo de los aminoácidos (Molina et al., 2019). Entre estos cambios graduales en los flujos metabólicos, podría albergarse el estímulo desencadenante de la activación del sistema Cbr. Por tanto, la D-(+)-glu 6P, el NADPH y el L-trp suponen óptimos candidatos a someterse a una evaluación pormenorizada por ITC al igual que otros metabolitos que en la bibliografía están descritos como ligandos distintivos del dominio PAS (FAD, FMN o grupo hemo), ante la dificultad técnica de ser estudiados por un ensayo DSF. Aunque estos resultados son todavía algo preliminares y hay que tomarlos con cierta cautela, ya que no se pueden excluir que otros metabolitos, con un desplazamiento térmico positivo pero inferior al umbral de significación preestablecido se unan a CbrA- $\Delta$ TM incluso con una afinidad menor, suponen un paso de gigante ante la posibilidad de ir acotando la naturaleza de las moléculas candidatas a ser activadoras del TCS CbrAB. Los resultados obtenidos a través de una aproximación por DSF ha aportado competentes candidatos a ligandos de CbrA. El lógico paso subsiguiente consistiría en realizar una evaluación robusta con métodos de interacción directa. El estrecho vínculo de los metabolitos sugeridos con el metabolismo del carbono y del nitrógeno y una factible detección intracelular hace pensar que

el estímulo responsable de la activación de CbrA implicaría un metabolito central o un desequilibrio en el estado energético de la célula, tal y como apuntan nuestros prometedores resultados por DSF.

Esta Tesis doctoral ha supuesto un avance en el conocimiento del mecanismo de regulación del sistema Cbr partiendo de una exhaustiva caracterización molecular de *cbrX* y *cbrA* hasta la evaluación de determinados metabolitos que pudieran estar vinculados a la señal responsable de la activación de este sistema único en la familia *Pseudomonadaceae*. Por primera vez, se obtiene información sobre el funcionamiento global de un sistema de dos componentes tan complejo en el que, además, confluyen múltiples vías regulatorias con el fin de coordinar perfectamente la fisiología de una bacteria ambiental sometida a constantes fluctuaciones del medio ambiente. Finalmente, se ha descrito la función principal de dos de los posibles dominios sensores de una HK cuya topología es sorprendentemente atípica y se ha asignado un posible origen de la señal percibida por CbrA.

## CONCLUSIONES



1. Los genes *cbrX* y *cbrA* se cotranscriben en una misma unidad transcripcional en la que *cbrX* dirige la traducción de CbrA mediante un mecanismo de acoplamiento traduccional de reiniciación de la traducción, que permitiría mantener una correcta estequiometría de las proteínas.
2. La cantidad de CbrB fosforilado producido en ausencia de CbrX es suficiente para activar la transcripción de genes que precisan poca cantidad del regulador, como es el caso de *crcZ*.
3. Los genes diana *crcZ* y *crcY* presentan un nivel de expresión basal superior a *PP2810* y requieren una menor concentración de CbrB fosforilado para su activación.
4. El gen *PP2810* presenta una gran capacidad para discriminar la fuente de carbono presente en el medio, lo que supone una ventaja adaptativa a la hora de detectar cambios sutiles en la actividad del sistema Cbr.
5. Los niveles de transcripción de CbrA no están autorregulados y, aunque independientes del estado de fosforilación de CbrB, son inversamente proporcionales a la disponibilidad de carbono. Además, el ARNm de *cbrX-cbrA* está sujeto a una regulación post-transcripcional por el complejo Hfq/Crc en condiciones de represión catabólica.
6. La exhaustiva búsqueda de un posible represor de la transcripción de *CrcZ* y *CrcY* no ha permitido identificar ningún elemento específico que medie la regulación del complejo Hfq/Crc sobre la expresión estos ARN reguladores.
7. El efecto de Hfq/Crc sobre la expresión de *crcZ* es epistático sobre la regulación indirecta ejercida por SigX que actuaría en otro nivel en la jerarquía regulatoria.
8. Los fenotipos descritos para un mutante  $\Delta cbrXA$  se corresponden con los de un mutante  $\Delta cbrB$ , lo cual indica que CbrA podría ser la única histidina quinasa responsable de desencadenar la activación del sistema Cbr en *P. putida*.
9. La proteína soluble CbrA- $\Delta$ TM es capaz de percibir la señal de limitación de carbono y activar parcialmente el sistema Cbr cuando se suministra en dosis elevadas, demostrando que los dominios TM de CbrA son prescindibles para su activación. No obstante, no se puede descartar un papel modulador de estos dominios TM en el proceso de detección de la señal.
10. La localización de la proteína CbrA nativa en la fracción de membrana y de CbrA- $\Delta$ TM en la fracción soluble sugiere que los dominios TM permiten el anclaje de CbrA a la membrana interna de la bacteria.
11. La actividad parcial de una versión de CbrA soluble en el citoplasma indica que la señal activadora del sistema Cbr debe de tener un origen intracelular o ser internalizada mediante un mecanismo aún desconocido.





## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J. A., Livingston, N. M., Egri, S. B., Guth, E., & Francklyn, C. S. (2017). Characterization of aminoacyl-tRNA synthetase stability and substrate interaction by differential scanning fluorimetry. *Methods*, 113(10), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.013>
- Abdou, L., Chou, H.-T., Haas, D., & Lu, C.-D. (2011). Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 193(11), 2784–2792. <https://doi.org/10.1128/JB.00164-11>
- Abramson, J., & Wright, E. M. (2009). Structure and function of Na(+)- symporters with inverted repeats. *Current Opinion in Structural Biology*, 19, 425–432.
- Albanesi, D., Martin, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M. C., Haouz, A., Alzari, P. M., de Mendoza, D., & Buschiazzi, A. (2009). Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 16185–16190.
- Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473(7346), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10069>
- Alm, E., Huang, K., & Arkin, A. (2006). The Evolution of Two-Component Systems in Bacteria Reveals Different Strategies for Niche Adaptation. *PLoS Computational Biology*, 2(11), e143. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020143>
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., & Carmeli, Y. (2006). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 43–48. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.43-48.2006>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389–3402. Retrieved from <http://us.expasy.org/sprot>
- Amador, C. I., Canosa, I., Govantes, F., & Santero, E. (2010). Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1748–1761. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02254.x>
- Amador, C. I., López-Sánchez, A., Govantes, F., Santero, E., & Canosa, I. (2016). A *Pseudomonas putida* cbrB transposon insertion mutant displays a biofilm hyperproducing phenotype that is resistant to dispersal. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 622–629. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12414>

- Anantharaman, V., & Arvind, L. (2000). Cache – a signaling domain common to Ca<sup>2+</sup>- channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 535–537.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2001). Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule- binding domains. *Journal of Molecular Biology*, 307, 1271–1292.
- Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2018). Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Crop Protection*, 105, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.009>
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1563–1589.
- Arai, H. (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00103>
- Asencion Diez, M. D., Peiru, S., Demonte, A. M., Gramajo, H., & Iglesias, A. A. (2012). Characterization of recombinant UDP- and ADP-glucose pyrophosphorylases and glycogen synthase to elucidate glucose-1-phosphate partitioning into oligo- and polysaccharides in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 194(6), 1485–1493. <https://doi.org/10.1128/JB.06377-11>
- Atkinson, M. R., & Ninfa, A. J. (1998). Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 29(2), 431–447. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00932.x>
- Austin, S., & Dixon, R. (1992). The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. *The EMBO Journal*, 11(6), 2219–2228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1534752>
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., & Miller, S. I. (2005). Recognition of Antimicrobial Peptides by a Bacterial Sensor Kinase. *Cell*, 122(3), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030>
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., & Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16(1–3), 237–247. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(81\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(81)90080-9)
- Bai, N., Roder, H., Dickson, A., & Karanicolas, J. (2019). Isothermal analysis of thermofluor data can readily provide quantitative binding affinities. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37072-x>

- Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R. P., & Dickerson, R. E. (1996). Structure of the Escherichia coli Response Regulator NarL †, ‡. *Biochemistry*, 35(34), 11053–11061. <https://doi.org/10.1021/bi960919o>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., & Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines Pseudomonas aeruginosa virulence. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Mori, M., & Wang, S. (2011). Sco proteins are involved in electron transfer processes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(3), 391–403. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0735-x>
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H., & Roberts, G. P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of Gram-negative bacteria. *Gene*, 109, 167–168. Retrieved from [https://ac.els-cdn.com/037811199190604A/1-s2.0-037811199190604A-main.pdf?\\_tid=45821148-4ca2-4eb4-9247-f4007eb2a0d5&acdnat=1538525309\\_66e67ac19cda3b1ecd3474517a2d6948](https://ac.els-cdn.com/037811199190604A/1-s2.0-037811199190604A-main.pdf?_tid=45821148-4ca2-4eb4-9247-f4007eb2a0d5&acdnat=1538525309_66e67ac19cda3b1ecd3474517a2d6948)
- Barakat, M., Ortet, P., & Whitworth, D. E. (2011). P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl\_1), D771–D776. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1023>
- Baraquet, C., Théraulaz, L., Guiral, M., Lafitte, D., Méjean, V., & Jourlin-Castelli, C. (2006). TorT, a member of a new periplasmic binding protein family, triggers Induction of the Tor respiratory system upon Trimethylamine N-Oxide electron-acceptor binding in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38189–38199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604321200>
- Barrios, H., Valderrama, B., & Morett, E. (1999). Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(22), 4305–4313. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4305>
- Barroso, R., García-Mauriño, S. M., Tomás-Gallardo, L., Andújar, E., Pérez-Alegre, M., Santero, E., & Canosa, I. (2018). The CbrB Regulon: Promoter dissection reveals novel insights into the CbrAB expression network in Pseudomonas putida. *PLOS ONE*, 13(12), e0209191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209191>
- Baskaran, S., Roach, P. J., DePaoli-Roach, A. A., & Hurley, T. D. (2010). Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17563–17568.
- Bass, R. B., Strop, P., Barclay, M., & Rees, D. C. (2002). Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science*, 298(5598), 1582–1587. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446901>
- Bastiaansen, K. C., Civantos, C., Bitter, W., & Llamas, M. A. (2017). New insights into the regulation of

- cell-surface signaling activity acquired from a mutagenesis screen of the *Pseudomonas putida* lutY sigma/anti-sigma factor. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00747>
- Bastiaansen, K. C., Ibanez, A., Ramos, J. L., Bitter, W., & Llamas, M. A. (2014). The Prc and RseP proteases control bacterial cell-surface signalling activity. *Environmental Microbiology*, 16, 2433–2443.
- Batchelor, J. D., Doucleff, M., Lee, C.-J., Matsubara, K., De Carlo, S., Heideker, J., Lamers, M. H., Pelton, J. G., & Wemmer, D. E. (2008). Structure and Regulatory Mechanism of Aquifex aeolicus NtrC4: Variability and Evolution in Bacterial Transcriptional Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 384(5), 1058–1075. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.024>
- Batchelor, J. D., Sterling, H. J., Hong, E., Williams, E. R., & Wemmer, D. E. (2009). Receiver domains control the active-state stoichiometry of Aquifex aeolicus sigma54 activator NtrC4, as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, 393, 634–643.
- Baughman, G., & Nomura, M. (1983). Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli*. *Cell*, 34, 979–988.
- Beier, D., & Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 143–152.
- Bhate, M. P., Molnar, K. S., Goulian, M., & DeGrado, W. F. (2015). Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure*, 23, 981–994.
- Bierman, M., Logan, R., O'brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N., & Schoner, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116, 43–49. Retrieved from [https://ac.els-cdn.com/0378111992906272/1-s2.0-0378111992906272-main.pdf?\\_tid=c1f068e2-0a82-45b1-a2c2-6311b6a3c365&acdnat=1539180963\\_1b7c357e69c2c6bd3d86849c9e013b35](https://ac.els-cdn.com/0378111992906272/1-s2.0-0378111992906272-main.pdf?_tid=c1f068e2-0a82-45b1-a2c2-6311b6a3c365&acdnat=1539180963_1b7c357e69c2c6bd3d86849c9e013b35)
- Bilwes, A. M., Quezada, C. M., Croal, L. R., Crane, B. R., & Simon, M. I. (2001). Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nature Structural Biology*, 8, 353–360.
- Binder, S. C., Eckweiler, D., Schulz, S., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Häussler, S., & Meyer-Hermann, M. (2016). Functional modules of sigma factor regulons guarantee adaptability and evolvability. *Scientific Reports*, 6(1), 22212. <https://doi.org/10.1038/srep22212>
- Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., Casilag, F., Düvel, J., Abraham, W. R., Kaefer, V., & Häussler, S. (2014). Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 196(2), 345–356. <https://doi.org/10.1128/JB.01034-13>

- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., & Jadeja, L. (1983). Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 5(2), 279–313. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.2.279>
- Boivin, S., Kozak, S., & Meijers, R. (2013). Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens. *Protein Expression and Purification*, 91(2), 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.002>
- Bott, M., Meyer, M., & Dimroth, P. (1995). Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 18, 533–546.
- Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloy, M. G., Orange, N., Hancock, R. E., Dufour, A., & Chevalier, S. (2012). Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. *Journal of Bacteriology*, 194, 4301–4311.
- Bouffartigues, E., Tortuel, D., Maillot, O., Dubot, V., Lesouhaitier, O., Orange, N., Feuilloy, M., Cornelis, P., & Chevalier, S. (2017). New insights into the molecular mechanisms regulating SigX activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *16th International Conference on Pseudomonas*. Liverpool, UK.
- Bourret, R. B., & Silversmith, R. E. (2010). Two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 113–115. <https://doi.org/doi:10.1016/j.mib.2010.02.003>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brinkman, F. S. L., Schoofs, G., Hancock, R. E. W., & De Mot, R. (1999). Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4746–4754.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 57–65.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 638–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y., & Gralla, J. D. (2000). The bacterial enhancer-dependent  $\sigma_{54}$  ( $\sigma(N)$ ) transcription factor. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, pp. 4129–4136. <https://doi.org/10.1128/JB.182.15.4129-4136.2000>
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N.,

- Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S. E., Feldblyum, T. V., D'Ascenzo, M., Deng, W.-L., Ramos, A. R., Alfano, J. R., Cartinhour, S., Chatterjee, A. K., Delaney, T. P., Lazarowitz, S. G., Martin, G. B., Schneider, D. J., Tang, X., Bender, C. L., White, O., Fraser, C. M., & Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10181–10186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731982100>
- Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J. L., & Krell, T. (2007). Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13774–13779. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701547104>
- Bush, M., & Dixon, R. (2012). The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of  $\sigma_{54}$ -dependent transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 76(3), 497–529. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-12>
- Butcher, B. G., Mascher, T., & Helmann, J. D. (2008). Environmental sensing and the role of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In *Bacterial Physiology – A Molecular Approach* (pp. 233–261). El-Sharoud, W.M. (ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Cai, S. J., & Inouye, M. (2002). EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 24155–24161.
- Camacho, E. M., & Casadesús, J. (2005). Regulation of *traJ* transcription in the *Salmonella* virulence plasmid by strand-specific DNA adenine hemimethylation. *Molecular Microbiology*, 57(6), 1700–1718. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04788.x>
- Cao, M., & Helmann, J. D. (2004). The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function  $\sigma_X$  factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *Journal of Bacteriology*, 186, 1136–1146.
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66, 325–347.
- Cases, I., de Lorenzo, V., & Ouzounis, C. A. (2003a). Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends in Microbiology*, 11, 248–253.
- Cases, I., Ussery, D. W., & De Lorenzo, V. (2003b). The  $\sigma_{54}$  regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 5(12), 1281–1293. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2003.00528.x>
- Chamnongpol, S., Cromie, M., & Groisman, E. A. (2003).  $Mg^{2+}$  sensing by the  $Mg^{2+}$  sensor PhoQ of *Salmonella enterica*. *Journal of Molecular Biology*, 325, 795–807.

of *Molecular Biology*, 325, 795–807.

- Chen, B., Sysoeva, T. A., Chowdhury, S., & Nixon, B. T. (2008). Regulation and action of the bacterial enhancer-binding protein AAA+ domains. *Biochemical Society Transactions*, 36(1), 89–93. <https://doi.org/10.1042/BST0360089>
- Cheung, J., Bingman, C. A., Reyngold, M., Hendrickson, W. A., & Waldburger, C. D. (2008). Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 13762–13770.
- Cheung, J., & Hendrickson, W. . (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.016>
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2008). Crystal structures of C4-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 30256–30265.
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2009). Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure*, 17, 190–201.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., & Cornelis, P. (2019). Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(7), 706–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.008>
- Cho, H. Y., Cho, H. J., Kim, Y. M., Oh, J. II, & Kang, B. S. (2009). Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 13057–13067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808905200>
- Choi, K. H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. A. R., & Schweizer, H. P. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods*, 2(6), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nmeth765>
- Choi, K. H., Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.001>
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2172–2175. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172>

- Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(4), 327–361. <https://doi.org/10.3109/07388559709146618>
- Collier, D. N., Spencer, C., Cox, M. J., & Phibbs, P. V. (2001). Isolation and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* pseudorevertants containing suppressors of the catabolite repression control defective *crc* 10 allele. *FEMS Microbiology Letters*, 196, 87–92.
- Corona, F. (2016). *Impacto del regulador global Crc en la fisiología de P. aeruginosa*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Corona, F., Martínez, J. L., & Nikel, P. I. (2019). The global regulator Crc orchestrates the metabolic robustness underlying oxidative stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 21(3), 898–912. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14471>
- Corona, F., Reales-Calderón, J. A., Gil, C., & Martínez, J. L. (2018). The development of a new parameter for tracking post-transcriptional regulation allows the detailed map of the *Pseudomonas aeruginosa* Crc regulon. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34741-9>
- Corral-Lugo, A., De la Torre, J., Matilla, M. A., Fernández, M., Morel, B., Espinosa-Urgel, M., & Krell, T. (2016). Assessment of the contribution of chemoreceptor-based signalling to biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3355–3372. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13170>
- Crosson, S., Rajagopal, S., & Moffat, K. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, 42, 2–10.
- Cybulski, L. E., del Solar, G., Craig, P. O., Espinosa, M., & de Mendoza, D. (2004). *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 39340–39347.
- D'Argenio, D. A., Wu, M., Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Déziel, E., Smith, E. E., Nguyen, H., Ernst, R. K., Larson Freeman, T. J., Spencer, D. H., Brittnacher, M., Hayden, H. S., Selgrade, S., Klausen, M., Goodlett, D. R., Burns, J. L., Ramsey, B. W., & Miller, S. I. (2007). Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* *lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Molecular Microbiology*, 64(2), 512–533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05678.x>
- Danson, A. E., Jovanovic, M., Buck, M., & Zhang, X. (2019). Mechanisms of  $\sigma^{54}$ -Dependent Transcription Initiation and Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 431(20), 3960–3974. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.022>
- De Carlo, S., Chen, B., Hoover, T. R., Kondrashkina, E., Nogales, E., & Nixon, B. T. (2006). The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. *Genes & Development*, 20, 1485–1495.



- De Lay, N., Schu, D. J., & Gottesman, S. (2013). Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 7996–8003. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.441386>
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6568–6572. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6568-6572.1990>
- del Castillo, T., & Ramos, J. L. (2007). Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. *Journal of Bacteriology*, 189, 6602–6610.
- Deng, B., Fu, L., Zhang, X., Zheng, J., Peng, L., Sun, J., Zhu, H., Wang, Y., Li, W., Wu, X., & Wu, D. (2014). The denitrification characteristics of *Pseudomonas stutzeri* SC221-M and its application to water quality control in grass carp aquaculture. *PLoS ONE*, 9(12), e114886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114886>
- Dixon, R. (1998). The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: A novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in  $\gamma$ -Proteobacteria. *Archives of Microbiology*, 169(5), 371–380. <https://doi.org/10.1007/s002030050585>
- Du, S., Bird, T. H., & Bauer, C. E. (1998). DNA Binding Characteristics of RegA. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18509–18513. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18509>
- Dubytska, L. (2019). *Borrelia burgdorferi* 297 bmpA encode the mRNA that contains ORF for a leader peptide that regulates bmpA gene expression. *BioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/542589>
- Duchesne, R., Bouffartigues, E., Oxaran, V., Maillot, O., Bénard, M., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., & Chevalier, S. (2013). A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *Journal of Proteomics*, 94, 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.022>
- Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., Clamens, T., Poc, C., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Heipieper, H. J., Cornelis, P., Chevalier, S., Fléchar, M., Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., Lagy, C., Maillot, O., Tortuel, D., Azuama, C. O., Clamens, T., Duclairoir-Poc, C., Catel-Ferreira, M., Gicquel, G., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Heipieper, H. J., Groleau, M.-C., Déziel, É., Cornelis, P., Chevalier, S., Poc, C., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Heipieper, H. J., Cornelis, P., & Chevalier, S. (2018). The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.*, 8(1), 17212. <https://doi.org/10.1038/s41598-018->

- Dunin-Horkawicz, S., & Lupas, A. N. (2010). Comprehensive analysis of HAMP domains: Implications for transmembrane signal transduction. *Journal of Molecular Biology*, 397(5), 1156–1174. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.031>
- Dunn, N. W., & Gunsalus, I. C. (1973). Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 114(3), 974–979. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4712575>
- Edgar, R. J., Xu, X., Shirley, M., Konings, A. F., Martin, L. W., Ackerley, D. F., & Lamont, I. L. (2014). Interactions between an anti-sigma protein and two sigma factors that regulate the pyoverdine signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0287-2>
- Efremov, R. G., Baradaran, R., & Sazanov, L. A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature*, 465(7297), 441–445. <https://doi.org/10.1038/nature09066>
- Eguchi, Y., Ishii, E., Hata, K., & Utsumi, R. (2011). Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 193, 1222–1228.
- Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A., & Utsumi, R. (2007). B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18712–18717. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705768104>
- Eswaramoorthy, P., Duan, D., Dinh, J., Dravis, A., Devi, S. N., & Fujita, M. (2010). The threshold level of the sensor histidine kinase KinA governs entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 192(15), 3870–3882. <https://doi.org/10.1128/JB.00466-10>
- Evans, T. C., Benner, J., & Xu, M. Q. (1998). Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Science*, 7(11), 2256–2264. <https://doi.org/10.1002/pro.5560071103>
- Federal Register. (1982). Certified host–vector systems. In *Appendix E* (Vol. 47). United States National Institutes of Health.
- Fernández, M., Morel, B., Corral-Lugo, A., Rico-Jiménez, M., Martín-Mora, D., López-Farfán, D., Reyes-Darias, J. A., Matilla, M. A., Ortega, Á., & Krell, T. (2016). Identification of ligands for bacterial sensor proteins. *Current Genetics*, 62(1), 143–147. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0528-4>
- Fernández, M., Rico-jiménez, M., Ortega, Á., Daddaoua, A., García, A. I. G., Martín-mora, D., Torres,

- N. M., Tajuelo, A., Matilla, M. A., & Krell, T. (2019). Determination of ligand profiles for pseudomonas aeruginosa solute binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205156>
- Figurski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- Filiatrault, M. J., Stodghill, P. V., Wilson, J., Butcher, B. G., Chen, H., Myers, C. R., & Cartinhour, S. W. (2013). CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in Pseudomonas syringae pathovar tomato strain DC3000. *RNA Biology*, 10(2), 245–255. <https://doi.org/10.4161/rna.23019>
- Fléchar, M., Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., Lagy, C., Maillot, O., Tortuel, D., Azuama, C. O., Clamens, T., Duclairoir-Poc, C., Catel-Ferreira, M., Gicquel, G., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Heipieper, H. J., Groleau, M. C., Déziel, É., Cornelis, P., & Chevalier, S. (2018). The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in Pseudomonas aeruginosa. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35503-3>
- Fling, M. E., Kopf, J., & Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)- O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 13, 7095–7106.
- Fonseca, P., Moreno, R., & Rojo, F. (2013). Pseudomonas putida growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. *Environmental Microbiology*, 15(1), 24–35. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02708.x>
- Foo, Y. H., Gao, Y., Zhang, H., & Kenney, L. J. (2015). Cytoplasmic sensing by the inner membrane histidine kinase EnvZ. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(3), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.04.005>
- Franklin, C. F., Bagdasarian, M. M., Bagdasarian, & Timmis, K. N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from Pseudomonas putida and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7458–7462. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7458>
- Galperin, M. Y. (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiology*, 5, 35.
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 13, pp. 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>

- Galperin, M. Y., Higdon, R., & Kolker, E. (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular BioSystems*, 6(4), 721–728. <https://doi.org/10.1039/b908047c>
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *Journal of Bacteriology*, 200(7), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-17>
- Gancedo, J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 673–704. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x>
- Ganesh, I., Ravikumar, S., Lee, S. H., Park, S. J., & Hong, S. H. (2013). Engineered fumarate sensing *Escherichia coli* based on novel chimeric two-component system. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.003>
- Gao, F., Danson, A. E., Ye, F., Jovanovic, M., Buck, M., & Zhang, X. (2020). Bacterial enhancer binding proteins—AAA+ proteins in transcription activation. *Biomolecules*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biom10030351>
- Gao, R., Bouillet, S., & Stock, A. M. (2019). Structural basis of response regulator function. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115931>
- Gao, R., Mack, T. R., & Stock, A. M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 32, pp. 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.002>
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63, 133–154.
- García-Fontana, C., Reyes-Darias, J. A., Muñoz-Martínez, F., Alfonso, C., Morel, B., Ramos, J. L., & Krell, T. (2013). High specificity in CheR methyltransferase function: CheR2 of *Pseudomonas putida* is essential for chemotaxis, whereas CheR1 is involved in biofilm formation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18987–18999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472605>
- García-Gonzalez, V., Govantes, F., Porrua, O., & Santero, E. (2005). Regulation of the *Pseudomonas* sp. Strain ADP Cyanuric Acid Degradation Operon. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 155–167. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.155-167.2005>
- García-Mauriño, S. M. (2014). *Caracterización del sistema de dos componentes CbrAB en Pseudomonas putida KT2442*. Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.
- García-Mauriño, S. M., Pérez-Martínez, I., Amador, C. I., Canosa, I., & Santero, E. (2013). Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator

- in *Pseudomonas putida*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 189–205.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.12270>
- García, V., Reyes-Darias, J. A., Martín-Mora, D., Morel, B., Matilla, M. A., & Krell, T. (2015). Identification of a chemoreceptor for C2 and C3 carboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5449–5457. <https://doi.org/10.1128/AEM.01529-15>
- García Vescovi, E., Sciara, M. I., & Castelli, M. E. (2010). Two component systems in the spatial program of bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 210–218.
- Garrrity, G., Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (2º Edición). Springer-Verlag, New York, NY.
- Georgellis, D., Kwon, O., & Lin, E. C. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*, 292, 2314–2316.
- Ghosh, A. S., Chowdhury, C., & Nelson, D. E. (2008). Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 16(7), 309–317.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.04.006>
- Ghosh, T., Bose, D., & Zhang, X. (2010). Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 611–627. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00239.x>
- Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., Connil, N., Bazire, A., Maillot, O., Bénard, M., Cornelis, P., Hancock, R. E. W., Dufour, A., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Déziel, E., & Chevalier, S. (2013). The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-related properties in *pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(11), 1–15.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080407>
- Giuliani, S. E., Frank, A. M., & Collart, F. R. (2008). Functional assignment of solute-binding proteins of ABC transporters using a fluorescence-based thermal shift assay. *Biochemistry*, 47(52), 13974–13984. <https://doi.org/10.1021/bi801648r>
- Glyde, R., Ye, F., Darbari, V. C., Zhang, N., Buck, M., & Zhang, X. (2017). Structures of RNA polymerase closed and intermediate complexes reveal mechanisms of DNA opening and transcription initiation. *Molecular Cell*, 67(1), 106-116.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.010>
- Glyde, R., Ye, F., Jovanovic, M., Kotta-Loizou, I., Buck, M., & Zhang, X. (2018). Structures of bacterial RNA polymerase complexes reveal the mechanism of DNA loading and transcription initiation. *Molecular Cell*, 70(6), 1111-1120.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.021>
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–13.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>

- Görke, B., & Stülke, J. (2008, August 1). Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 6, pp. 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Govantes, F., Andújar, E., & Santero, E. (1998). Mechanism of translational coupling in the nifLA operon of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO Journal*, 17(8), 2368–2377. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2368>
- Govantes, F., Molina-López, J. A., & Santero, E. (1996). Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 178(23), 6817–6823. <https://doi.org/10.1128/jb.178.23.6817-6823.1996>
- Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology*, 183, 1835–1842.
- Groisman, E. A. (2016). Feedback control of two-component regulatory systems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095331>
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 57, 441–466.
- Guest, R. L., Wang, J., Wong, J. L., & Raivio, T. L. (2017). A bacterial stress response regulates respiratory protein complexes to control envelope stress adaptation. *Journal of Bacteriology*, 199(20). <https://doi.org/10.1128/JB.00153-17>
- Haas, D., & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307–319.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>
- Hang, S., Purdy, A. E., Robins, W. P., Wang, Z., Mandal, M., Chang, S., Mekalanos, J. J., & Watnick, P. I. (2014). The acetate switch of an intestinal pathogen disrupts host insulin signaling and lipid metabolism. *Cell Host & Microbe*, 16(5), 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.006>
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: High-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 9–19.
- Hazelbauer, G. L., & Lai, W. C. (2010). Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 124–132.
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap

- extension. *Nature Protocols*, 2(4), 924–932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
- Heermann, R., & Jung, K. (2010). The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 304(2), 97–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01906.x>
- Hefti, M. H., François, K.-J., de Vries, S. C., Dixon, R., & Vervoort, J. (2004). The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *European Journal of Biochemistry*, 271(6), 1198–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04023.x>
- Helmann, J. D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial Physiology*, 46, 47–110.
- Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*, 261–286. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-micro-121809-151631>
- Hernández-Arranz, S., Moreno, R., & Rojo, F. (2012). The translational repressor Crc controls the *Pseudomonas putida* benzoate and alkane catabolic pathways using a multi-tier regulation strategy. *Environmental Microbiology*, 15, 227–241.
- Hernández-Arranz, S., Sánchez Hevia, D., Rojo, F., & Renata, M. (2016). Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA. *RNA*, 22(12), 1902–1917. <https://doi.org/10.1261/rna.058313.116>
- Hervás, A. B., Canosa, I., & Santero, E. (2010). Regulation of glutamate dehydrogenase expression in *Pseudomonas putida* results from its direct repression by NtrC under nitrogen-limiting conditions. *Molecular Microbiology*, 78(2), 305–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07329.x>
- Hess, J. F., Bourret, R. B., & Simon, M. I. (1988). Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature*, 336, 139–143.
- Hester, K. L., Lehman, J., Najar, F., Song, L., Roe, B. A., MacGregor, C. H., Hager, P. W., Phibbs, J., & Sokatch, J. R. (2000a). Crc is involved in catabolite repression control of the bkd operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1144–1149. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1144-1149.2000>
- Hester, K. L., Madhusudhan, K. T., & Sokatch, J. R. (2000b). Catabolite repression control by Crc in 2xYT medium is mediated by posttranscriptional regulation of bkdR expression in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1150–1153. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1150-1153.2000>
- Hickman, J. W., & Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-

- di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 69, 376–389.
- Hilger, D., Böhm, M., Hackmann, A., & Jung, H. (2008). Role of Ser-340 and Thr-341 in transmembrane domain IX of the Na<sup>+</sup>/proline transporter PutP of *Escherichia coli* in ligand binding and transport. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 4921–4929.
- Ho, T. D., & Ellermeier, C. D. (2012). Extra cytoplasmic function  $\sigma$  factor activation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.01.001>
- Ho, Y. S., Burden, L. M., & Hurley, J. H. (2000). Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO Journal*, 19, 5288–5299.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., & Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00130-9)
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 165–170.
- Hoffmann, N., & Rehm, B. H. . (2004). Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 237(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x>
- Hsieh, Y.-J., & Wanner, B. L. (2010). Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.014>
- Huang, J., Sonnleitner, E., Ren, B., Xu, Y., & Haas, D. (2012). Catabolite repression control of pyocyanin biosynthesis at an intersection of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 5016–5020. <https://doi.org/10.1128/AEM.00026-12>
- Huber, M., Faure, G., Laass, S., Kolbe, E., Seitz, K., Wehrheim, C., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Soppa, J. (2019). Translational coupling via termination-reinitiation in archaea and bacteria. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11999-9>
- Humair, B., González, N., Mossialos, D., Reimann, C., & Haas, D. (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *ISME Journal*, 3(8), 955–965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.42>
- Hunke, S., Keller, R., & Müller, V. (2012). Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiology Letters*, 326, 12–22.



- Hutchings, M. I., Hong, H. J., & Buttner, M. J. (2006). The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 59, 923–935.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2265755>
- Ishii, E., Eguchi, Y., & Utsumi, R. (2013). Mechanism of activation of PhoQ/PhoP two-component signal transduction by SafA, an auxiliary protein of PhoQ histidine kinase in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 814–819.
- Itoh, Y., Nishijyo, T., & Nakada, Y. (2007). Histidine catabolism and catabolite regulation. In *Pseudomonas* (Vol. 5, pp. 371–395). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6097-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6097-7_13)
- Itou, J., Eguchi, Y., & Utsumi, R. (2009). Molecular mechanism of transcriptional cascade initiated by the EvgS/EvgA system in *Escherichia coli* K-12. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(4), 870–878. <https://doi.org/10.1271/bbb.80795>
- Jacob, K., Rasmussen, A., Tyler, P., Servos, M. M., Sylla, M., Prado, C., Daniele, E., Sharp, J. S., & Purdy, A. E. (2017). Regulation of acetyl-CoA synthetase transcription by the CrbS/R two-component system is conserved in genetically diverse environmental pathogens. *PLOS ONE*, 12(5), e0177825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177825>
- Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., & Kivisaar, M. (2010). Molecular characterization of Rif<sup>r</sup> mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 683(1–2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.015>
- Jiang, P., & Ninfa, A. J. (2009). Alpha-ketoglutarate controls the ability of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein to regulate the activities of NRII (NrB) but does not control the binding of PII to NRII. *Biochemistry*, 48, 11514–11521.
- Jimenez-Fernandez, A., Lopez-Sanchez, A., Calero, P., & Govantes, F. (2015). The c-di-GMP phosphodiesterase BifA regulates biofilm development in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 78–84. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12153>
- Jing, X., Jaw, J., Robinson, H. H., & Schubot, F. D. (2010). Crystal structure and oligomeric state of the RetS signaling kinase sensory domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(7), 1631–1660. <https://doi.org/10.1002/prot.22679>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>

- Jung, H. (2002). The sodium/substrate symporter family: Structural and functional features. *FEBS Letters*, Vol. 529, pp. 73–77. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03184-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03184-8)
- Jung, H., Hilger, D., & Raba, M. (2012). The Na<sup>+</sup>/L-proline transporter PutP. *Frontiers in Bioscience*, 17, 745–759.
- Jung, K., Fabiani, F., Hoyer, E., & Lassak, J. (2018). Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing. *Open Biology*, 8(4), 180023. <https://doi.org/10.1098/rsob.180023>
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., & Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology*, 15(2), 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>
- Kambara, T. K., Ramsey, K. M., & Dove, S. L. (2018). Pervasive targeting of nascent transcripts by Hfq. *Cell Reports*, 23(5), 1543–1552. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.134>
- Kanamaru, K., Aiba, H., Mizushima, S., & Mizuno, T. (1989). Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. A single amino acid change in the protein kinase, EnvZ, results in loss of its phosphorylation and dephosphorylation abilities with respect to the activator protein, OmpR. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21633–21637. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2689444>
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L., & Bott, M. (1999). The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Molecular Microbiology*, 33(4), 858–872. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01536.x>
- Kato, A., & Groisman, E. A. (2004). Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes & Development*, 18(18), 2302–2313. <https://doi.org/10.1101/gad.1230804>
- Kavita, K., de Mets, F., & Gottesman, S. (2018). New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.014>
- Key, J., Hefti, M. H., Purcell, E. B., & Moffat, K. (2007). Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism. *Biochemistry*, 46, 3614–3623.
- Key, J., Srajer, V., Pahl, R., & Moffat, K. (2007). Time-resolved crystallographic studies of the hemedomain of the oxygen Sensor FixL: Structural dynamics of ligand rebinding and their relation to signal transduction. *Biochemistry*, 46(16), 4706–4715. <https://doi.org/10.1021/bi700043c>
- Kim, J., & Park, W. (2014). Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology*

and *Biotechnology*, 98, 6933–6946.

Kirby, J. R. (2009). Chemotaxis-like regulatory systems: unique roles in diverse bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 45–59.

Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., & de Vos, W. M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24, 895–904.

Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., & Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>

Korycinski, M., Albrecht, R., Ursinus, A., Hartmann, M. D., Coles, M., Martin, J., Dunin-Horkawicz, S., & Lupas, A. N. (2015). STAC—A New Domain Associated with Transmembrane Solute Transport and Two-Component Signal Transduction Systems. *Journal of Molecular Biology*, 427(20), 3327–3339. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.017>

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Pinkner, J. S., & Hultgren, S. J. (2009). QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 73, 1020–1031.

Koteva, K., Hong, H.-J., Wang, X. D., Nazi, I., Hughes, D., Naldrett, M. J., Buttner, M. J., & Wright, G. D. (2010). A vancomycin photoprobe identifies the histidine kinase VanSsc as a vancomycin receptor. *Nature Chemical Biology*, 6(5), 327–329. <https://doi.org/10.1038/nchembio.350>

Kox, L. F., Wösten, M. M., & Groisman, E. A. (2000). A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *The EMBO Journal*, 19(8), 1861–1872. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1861>

Krell, T. (2015). Tackling the bottleneck in bacterial signal transduction research: high-throughput identification of signal molecules. *Molecular Microbiology*, 96(4), 685–688. <https://doi.org/10.1111/mmi.12975>

Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 539–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134054>

Krishna, S. N., Luan, C.-H., Mishra, R. K., Xu, L., Scheidt, K. A., Anderson, W. F., & Bergan, R. C. (2013). A fluorescence-based thermal shift assay identifies inhibitors of mitogen activated protein kinase kinase 4. *PLoS ONE*, 8(12), e81504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081504>

Kumar, S., Mukherjee, M. M., & Varela, M. F. (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux

- pumps of the Major Facilitator Superfamily. *International Journal of Bacteriology*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/204141>
- La Rosa, R., Behrends, V., Williams, H. D., Bundy, J. G., & Rojo, F. (2016). Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 18(3), 807–818. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13126>
- La Rosa, R., Nogales, J., & Rojo, F. (2015). The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 17(9), 3362–3378. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12812>
- Lacal, J., Alfonso, C., Liu, X., Parales, R. E., Morel, B., Conejero-Lara, F., Rivas, G., Duque, E., Ramos, J. L., & Krell, T. (2010). Identification of a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates: differential chemotactic response towards receptor ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 23126–23136.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lambertsen, L., Sternberg, C., & Molin, S. (2004). Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environmental Microbiology*, 6(7), 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x>
- Laskowski, M. A., & Kazmierczak, B. I. (2006). Mutational analysis of RetS, an unusual sensor kinase-response regulator hybrid required for *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Infection and Immunity*, 74(8), 4462–4473. <https://doi.org/10.1128/IAI.00575-06>
- Lee, A. I., Delgado, A., & Gunsalus, R. P. (1999). Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: Nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *Journal of Bacteriology*, 181, 5309–5316.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, 7(10). <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90>
- Lee, J., Owens, J. T., Hwang, I., Meares, C., & Kustu, S. (2000). Phosphorylation-induced signal propagation in the response regulator NtrC. *Journal of Bacteriology*, 182(18), 5188–5195. <https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5188-5195.2000>
- Lee, J. Y., Peck, K. R., & Ko, K. S. (2013). Selective advantages of two major clones of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates (CC235 and CC641) from Korea: antimicrobial resistance, virulence and biofilm-forming activity. *Journal of Medical Microbiology*, 62(7), 1015–

- Lee, S. Y., De La Torre, A., Yan, D., Kustu, S., Nixon, B. T., & Wemmer, D. E. (2003). Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. *Genes & Development*, 17(20), 2552–2563. <https://doi.org/10.1101/gad.1125603>
- Leonard, P. G., Golemi-Kotra, D., & Stock, A. M. (2013). Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in staphylococcus aureus VraR activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 8525–8530.
- Li, W., & Lu, C. D. (2007). Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5413–5420. <https://doi.org/10.1128/JB.00432-07>
- Liljestrom, P., Laamanen, I., & Palva, E. T. (1988). Structure and expression of the ompB operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* LT-2. *Journal of Molecular Biology*, 201, 663–673.
- Linares, J. F., Moreno, R., Fajardo, A., Martínez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F., & Martínez, J. L. (2010). The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 12(12), 3196–3212. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02292.x>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Little, S., Hyde, S., Campbell, C. J., Lilley, R. J., & Robinson, M. K. (1989). Translational coupling in the threonine operon of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 171, 3518–3522.
- Lo, M.-C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., & Ellestad, G. (2004). Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry*, 332(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.031>
- Locher, K. P. (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1514), 239–245. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0125>
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E., & Buttner, M. J. (1994). Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase  $\sigma$  factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7573–7577.

- Lonetto, M. A., Gribskov, M., & Gross, C. A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of Bacteriology*, 174, 3843–3849.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Løvdok, L., Bentele, K., Vladimirov, N., Müller, A., Pop, F. S., Lebiedz, D., Kollmann, M., & Sourjik, V. (2009). Role of translational coupling in robustness of bacterial chemotaxis pathway. *PLoS Biology*, 7(8), e1000171. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000171>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265–275.
- Lugtenberg, B. J. J., & Dekkers, L. C. (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*, 1(1), 9–13. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00005.x>
- Madhushani, A., del Peso-Santos, T., Moreno, R., Rojo, F., & Shingler, V. (2015). Transcriptional and translational control through the 5'-leader region of the *dmpR* master regulatory gene of phenol metabolism. *Environmental Microbiology*, 17(1), 119–133. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12511>
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., & Nakata, A. (1989). Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *Journal of Molecular Biology*, 210(3), 551–559.
- Malpica, R., Franco, B., Rodríguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 13318–13323.
- Mao, F., Dam, P., Chou, J., Oltman, V., & Xu, Y. (2009). DOOR: A database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Research*, 37, 459–463. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn757>
- Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W. A., & Waldburger, C. D. (2001). Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 41182–41190.
- Marina, A., Waldburger, C. D., & Hendrickson, W. A. (2005). Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO Journal*, 24, 4247–4259.
- Martín-Mora, D., Fernández, M., Velando, F., Ortega, Á., Gavira, J., Matilla, M., Krell, T., Martín-Mora, D., Fernández, M., Velando, F., Ortega, Á., Gavira, J. A., Matilla, M. A., & Krell, T. (2018).

- Functional Annotation of Bacterial Signal Transduction Systems: Progress and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3755. <https://doi.org/10.3390/ijms19123755>
- Martín-Mora, D., Reyes-Darias, J. A., Ortega, Á., Corral-Lugo, A., Matilla, M. A., & Krell, T. (2016). McpQ is a specific citrate chemoreceptor that responds preferentially to citrate/metal ion complexes. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3284–3295. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13030>
- Martin, M., Albanesi, D., Alzari, P. M., & de Mendoza, D. (2009). Functional in vitro assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK. *Protein Expression and Purification*, 66, 39–45.
- Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., & Dixon, R. (2004). The NifL-NifA System: A multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 601–610. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.601-610.2004>
- Martínez-Bueno, M. A., Tobes, R., Rey, M., & Ramos, J. L. (2002). Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environmental Microbiology*, 4(12), 842–855. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00371.x>
- Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S., & de Lorenzo, V. (2015). SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1183–D1189. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1114>
- Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., & Espinosa-Urgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, 77(3), 549–561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x>
- Martínez-Hackert, E., & Stock, A. M. (1997). Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *Journal of Molecular Biology*, 269, 301–312.
- Martínez-Pérez, O., Moreno-Ruiz, E., Floriano, B., & Santero, E. (2004). Regulation of tetralin biodegradation and identification of genes essential for expression of the operons. *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6101–6109. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6101-6109.2004>
- Martínez-Valenzuela, M., Guzmán, J., Moreno, S., Ahumada-Manuel, C. L., Espín, G., & Núñez, C. (2018). Expression of the sRNAs CrcZ and CrcY modulate the strength of carbon catabolite

- repression under diazotrophic or non-diazotrophic growing conditions in *Azotobacter vinelandii*. *PLOS ONE*, 13(12), e0208975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208975>
- Martínez, J. L., & Rojo, F. (2011). Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 768–789. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x>
- Martinez, M., Duclert-Savatier, N., Betton, J.-M., Alzari, P. M., Nilges, M., & Malliavin, T. E. (2016). Modification in hydrophobic packing of HAMP domain induces a destabilization of the auto-phosphorylation site in the histidine kinase CpxA. *Biopolymers*, 105(10), 670–682. <https://doi.org/10.1002/bip.22864>
- Martins dos Santos, V. A. P., Heim, S., Moore, E. R. B., Strätz, M., & Timmis, K. . (2004a). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 6, 1264–1286.
- Martins dos Santos, V. A. P., Timmis, K. N., Tümmler, B., & Weinl, C. (2004b). Genomic Features of *Pseudomonas putida* Strain KT2440. In *Pseudomonas* (Vol. 1, pp. 77–112). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9086-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9086-0_3)
- Mascher, T. (2013). Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factors. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.001>
- Mascher, T. (2014). Bacterial (intramembrane-sensing) histidine kinases: signal transfer rather than stimulus perception. *Trends in Microbiology*, 22(10), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.006>
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910–938. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-06>
- Matilla, M. A., Travieso, M. L., Ramos, J. L., & Ramos-González, M. I. (2011). Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: Its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1745–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02499.x>
- McCarthy, J. E. G., & Gualerzi, C. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends in Genetics*, 6, 78–85. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90098-Q](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90098-Q)
- Merrick, M. J. (1993). In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Molecular Microbiology*, 10(5), 903–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00961.x>
- Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baysse, C., Cornelis, P., Barelmann, I., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (2002). Siderophore-mediated iron uptake in fluorescent *Pseudomonas*: Characterization of the



- pyoverdine-receptor binding site of three cross-reacting pyoverdines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 179–183. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2667>
- Migula, W. (1894). Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriolog Inst Karlsruhe*, 1, 235–328.
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N. Y.
- Milojevic, T., Grishkovskaya, I., Sonnleitner, E., Djinojic-Carugo, K., & Bläsi, U. (2013). The *Pseudomonas aeruginosa* catabolite repression control protein Crc is devoid of RNA binding activity. *PLoS ONE*, 8(5), e64609. <https://doi.org/10.3233/NPM-915141>
- Mishra, M., Parise, G. J., Ackson, K. D., Wozniak, D. J., & Deora, R. (2005). The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *Journal of Bacteriology*, 187, 1474–1484.
- Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure*, 17(10), 1282–1294. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>
- Molina, L., Rosa, R. La, Nogales, J., & Rojo, F. (2019). *Pseudomonas putida* KT2440 metabolism undergoes sequential modifications during exponential growth in a complete medium as compounds are gradually consumed. *Environmental Microbiology*, 21(7), 2375–2390. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14622>
- Mondéjar, L. G., Lupas, A., Schultz, A., & Schultz, J. E. (2012). HAMP domain-mediated signal transduction probed with a mycobacterial adenyl cyclase as a reporter. *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1022–1031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284067>
- Monteagudo-Cascales, E., García-Mauriño, S. M., Santero, E., & Canosa, I. (2019). Unraveling the role of the CbrA histidine kinase in the signal transduction of the CbrAB two-component system in *Pseudomonas putida*. *Scientific Reports*, 9(1), 9110. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45554-9>
- Moore, J. O., & Hendrickson, W. A. (2009). Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure*, 17, 1195–1204.
- Moreno, R., Fonseca, P., & Rojo, F. (2012). Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Molecular Microbiology*, 83(1), 24–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07912.x>
- Moreno, R., Hernández-Arranz, S., La Rosa, R., Yuste, L., Madhushani, A., Shingler, V., & Rojo, F. (2015). The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environmental Microbiology*, 17(1), 105–118. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12499>

- Moreno, R., Martínez-Gomariz, M., Yuste, L., Gil, C., & Rojo, F. (2009a). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: Evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics*, 9(11), 2910–2928. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800918>
- Moreno, R., Marzi, S., Romby, P., & Rojo, F. (2009b). The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* alkS mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Research*, 37(22), 7678–7690. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp825>
- Moreno, R., & Rojo, F. (2008). The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1539–1545. <https://doi.org/10.1128/JB.01604-07>
- Moreno, R., Ruiz-Manzano, A., Yuste, L., & Rojo, F. (2007). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. *Molecular Microbiology*, 64(3), 665–675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05685.x>
- Muda, M., Rao, N. N., & Torriani, A. (1992). Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *Journal of Bacteriology*, 174, 8057–8064.
- Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2012a). Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.12.003>
- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sánchez, D., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2012b). Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 455–464.
- Muller, S., Gotz, M., & Beier, D. (2009). Histidine residue 94 is involved in pH sensing by histidine kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE*, 4, e6930.
- Muzhingi, I., Prado, C., Sylla, M., Diehl, F. F., Nguyen, D. K., Servos, M. M., Flores Ramos, S., & Purdy, A. E. (2018). Modulation of CrbS-Dependent Activation of the Acetate Switch in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 200(23). <https://doi.org/10.1128/JB.00380-18>
- Nakazawa, T. (2003, December). Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environmental Microbiology*, Vol. 5, p. 78. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00310.x>
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., & Crews, S. T. (1991). The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, 67, 1157–1167.

- Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D., Bassler, B. L., & Hughson, F. M. (2006). Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell*, 126, 1095–1118.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K. N., Dusterhöft, A., Tümmeler, B., & Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2(9), 2212–2221. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321>
- Nikel, P. I., & de Lorenzo, V. (2014). Robustness of *Pseudomonas putida* KT2440 as a host for ethanol biosynthesis. *New Biotechnology*, 31(6), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.006>
- Ninfa, A. J., & Bennett, R. L. (1991). Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 6888–6893.
- Ninfa, A. J., & Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 5909–5913.
- Ninfa, E. G., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., & Ninfa, A. J. (1993). Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NR(II) or NtrB): trans-Phosphorylation between subunits. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 7024–7032. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.7024-7032.1993>
- Nishijyo, T., Haas, D., & Itoh, Y. (2001). The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 40(4), 917–931. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02435.x>
- Normand, P., Caumette, P., Goulas, P., Pujic, P., & Wisniewski-Dyé, F. (2015). Adaptations of Prokaryotes to Their Biotopes and to Physicochemical Conditions in Natural or Anthropized Environments. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (pp. 293–351). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2_9)
- O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., & Kolter, R. (2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm

- development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 425–431.  
<https://doi.org/10.1128/JB.182.2.425-431.2000>
- O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., & Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology*, 310, 91–109.
- Okkotsu, Y., Little, A. S., & Schurr, M. J. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00082>
- Olivera, B. C. L., Ugalde, E., & Martínez-Antonio, A. (2010). Regulatory dynamics of standard two-component systems in bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 264(2), 560–569.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.02.008>
- Oppenheim, D. S., & Yanofsky, C. (1980). Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics*, 95, 785–795.
- Österberg, S., Skärfstad, E., & Shingler, V. (2010). The  $\sigma$ -factor FliA, ppGpp and DksA coordinate transcriptional control of the *aer2* gene of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02139.x>
- Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012, February 3). Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, Vol. 63, pp. 239–248.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8>
- Paget, M. S., & Helmann, J. D. (2003). The  $\sigma$ 70 family of sigma factors. *Genome Biology*, 4, 203.
- Palleroni, N. J. (2005). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity, D. R. Boone, & P. Vos (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, Boston, MA.
- Palleroni, N. J., & Moore, E. R. (2004). *Pseudomonas*. In J. L. Ramos (Ed.), *Taxonomy of Pseudomonads: experimental approaches*. (pp. 3–44). New York: Kluwer Academic.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P., & Salemme, F. R. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, 6(6), 429–440.  
<https://doi.org/10.1089/108705701753364922>
- Parkinson, J. S. (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, Vol. 73, pp. 857–871.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90267-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90267-T)
- Parkinson, J. S. (2010). Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor

- kinases. *Annual Review of Microbiology*, 64, 101–122.
- Parkinson, J. S., Hazelbauer, G. L., & Falke, J. J. (2015). Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology*, 23(5), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.003>
- Parkinson, J. S., & Kofoed, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual Review of Genetics*, 26, 71–112.
- Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13, 27–33.
- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S. A., Mavrodi, D. V., DeBoy, R. T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Sullivan, S. A., Rosovitz, M. J., Gwinn, M. L., Zhou, L., Schneider, D. J., Cartinhour, S. W., Nelson, W. C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E. A., Pierson, L. S., Thomashow, L. S., & Loper, J. E. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*, 23(7), 873–878. <https://doi.org/10.1038/nbt1110>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Peix, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., & Velázquez, E. (2003). *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2067–2072. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02703-0>
- Perez, J. C., & Groisman, E. A. (2007). Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 63, 283–293.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., & Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7563–7568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502025112>
- Pestova, E. V., Håvarstein, L. S., & Morrison, D. A. (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an autoinduced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology*, 21, 853–862.
- Pflock, M., Dietz, P., Schär, J., & Beier, D. (2004). Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, 234, 51–61.
- Platt, R., Drescher, C., Park, S. K., & Phillips, G. J. (2000). Genetic system for reversible integration of

- DNA constructs and lacZ gene fusions into the Escherichia coli chromosome. *Plasmid*, 43, 12–23.
- Podust, L. M., Ioanoviciu, A., & Ortiz de Montellano, P. R. (2008). 2.3 Å X-ray structure of the heme-bound GAF domain of sensory histidine kinase DosT of Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*, 47, 12523–12531.
- Ponting, C. P., & Aravind, L. (1997). PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Current Biology*, 7, R674–R677.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 479–487. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479-487.2005>
- Porrúa, O., García-González, V., Santero, E., Shingler, V., & Govantes, F. (2009). Activation and repression of a  $\sigma$ -dependent promoter naturally lacking upstream activation sequences. *Molecular Microbiology*, 73(3), 419–433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06779.x>
- Posch, A., Kohn, J., Oh, K., Hammond, M., & Liu, N. (2013). V3 Stain-free Workflow for a Practical, Convenient, and Reliable Total Protein Loading Control in Western Blotting. *Journal of Visualized Experiments*, (82), 1–9. <https://doi.org/10.3791/50948>
- Potvin, E., Sanschagrin, F., & Levesque, R. C. (2008). Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x>
- Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J. F., Phaneuf, E., & Massé, E. (2007). The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology*, 64, 1260–1273.
- Purcell, E. B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D. C., Fiebig, A., & Crosson, S. (2007). A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18241–18246.
- Qi, S.-H., Xu, Y., Gao, J., Qian, P.-Y., & Zhang, S. (2009). Antibacterial and antilarval compounds from marine bacterium Pseudomonas rhizosphaerae. *Annals of Microbiology*, 59, 229–233.
- Quax, T. E. F., Wolf, Y. I., Koehorst, J. J., Wurtzel, O., vanderOost, R., Ran, W., Blombach, F., Makarova, K. S., Brouns, S. J. J., Forster, A. C., Wagner, E. G. H., Sorek, R., Koonin, E. V., & vanderOost, J. (2013). Differential translation tunes uneven production of operon-encoded proteins. *Cell Reports*, 4(5), 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.049>
- Quiroz-Rocha, E., Bonilla-Badía, F., García-Aguilar, V., López-Pliego, L., Serrano-Román, J., Cocotl-Yañez, M., Guzmán, J., Ahumada-Manuel, C. L., Muriel-Millán, L. F., Castañeda, M., Espín, G., & Nuñez, C. (2017a). Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in Azotobacter vinelandii. *Microbiology*, 163(7), 1105–1115. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000457>

- Quiroz-Rocha, E., Moreno, R., Hernández-Ortíz, A., Fragoso-Jiménez, J. C., Muriel-Millán, L. F., Guzmán, J., Espín, G., Rojo, F., & Núñez, C. (2017b). Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00980-5>
- Rajagopal, S., & Moffat, K. (2003). *Crystal structure of a photoactive yellow protein from a sensor histidine kinase: Conformational variability and signal transduction*. 100(10), 1649–1654. Retrieved from [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0336353100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0336353100)
- Rakette, S., Donat, S., Ohlsen, K., & Stehle, T. (2012). Structural analysis of staphylococcus aureus serine/threonine kinase PknB. *PLoS ONE*, 7(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039136>
- Raman, G., Avendano, E. E., Chan, J., Merchant, S., & Puzniak, L. (2018). Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0370-9>
- Ramos-González, M. I., Travieso, M. L., Soriano, M. I., Matilla, M. A., Huertas-Rosales, Ó., Barrientos-Moreno, L., Tagua, V. G., & Espinosa-Urgel, M. (2016). Genetic dissection of the regulatory network associated with high c-di-GMP levels in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01093>
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., Teran, W., & Segura, A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 56, 743–768.
- Rappas, M., Bose, D., & Zhang, X. (2007). Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking  $\sigma^{54}$ -dependent gene transcription. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.11.002>
- Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885–4890. <https://doi.org/10.1073/pnas.060030097>
- Reales-Calderón, J. A., Corona, F., Monteoliva, L., Gil, C., & Martínez, J. L. (2015). Quantitative proteomics unravels that the post-transcriptional regulator Crc modulates the generation of vesicles and secreted virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Proteomics*, 127, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.06.009>
- Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,

- Rex, G., Surin, B., Besse, G., Schneppe, B., & McCarthy, J. E. (1994). The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. Higher order structure in the *atpHA* mRNA acts as a conformational switch regulating the access of de novo initiating ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 18118–18127.
- Reyes-Darias, J. A., García, V., Rico-Jiménez, M., Corral-Lugo, A., Lesouhaitier, O., Juárez-Hernández, D., Yang, Y., Bi, S., Feuilloley, M., Muñoz-Rojas, J., Sourjik, V., & Krell, T. (2015). Specific gamma-aminobutyrate chemotaxis in pseudomonads with different lifestyle. *Molecular Microbiology*, 97(3), 488–501. <https://doi.org/10.1111/mmi.13045>
- Rheinwald, J. G., Chakrabarty, A. M., & Gunsalus, I. C. (1973). A Transmissible Plasmid Controlling Camphor Oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 885–889. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.885>
- Robleto, E. A., López-Hernández, I., Silby, M. W., & Levy, S. B. (2003). Genetic analysis of the *AdnA* regulon in *Pseudomonas fluorescens*: Nonessential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 185(2), 453–460. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.453-460.2003>
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 34, pp. 658–684. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x>
- Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, K. H., Knackmuss, H. J., & Timmis, K. N. (1987). Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science*, 238(4832), 1395–1398. <https://doi.org/10.1126/science.3479842>
- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, 250(5463), 194–199. <https://doi.org/10.1038/250194a0>
- Ruiz-Manzano, A., Yuste, L., & Rojo, F. (2005). Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3678–3686. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3678-3686.2005>
- Salis, H. M. (2011). The ribosome binding site calculator. *Methods in Enzymology*, 498, 19–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00002-4>
- Salvado, B., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2015). A survey of HK, HPT, and RR domains and their organization in two-component systems and phosphorelay proteins of organisms with fully sequenced genomes. *PeerJ*, 3, e1183. <https://doi.org/10.7717/peerj.1183>



- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2000). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N. Y.
- Sánchez, D. G., Primo, E. D., Damiani, M. T., & Lisa, A. T. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* gbdR gene is transcribed from a  $\sigma_{54}$ -dependent promoter under the control of NtrC/CbrB, IHF and BetI. *Microbiology*, 163(9), 1343–1354. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000502>
- Sanders, D. A., Gillece-Castro, B. L., Burlingame, A. L., & Koshland, D. E. (1992). Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. *Journal of Bacteriology*, 174, 5117–5122.
- Sauer, E. (2013). Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biology*, 10(4), 610–618. <https://doi.org/10.4161/rna.24201>
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409, 258–268.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulte, M., Mattay, D., Kriegel, S., Hellwig, P., & Friedrich, T. (2014). Inhibition of Escherichia coli respiratory complex I by Zn<sup>2+</sup>. *Biochemistry*, 53(40), 6332–6339. <https://doi.org/10.1021/bi5009276>
- Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Düvel, J., & Häussler, S. (2015). Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLOS Pathogens*, 11(3), e1004744. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004744>
- Schumacher, J., Behrends, V., Pan, Z., Brown, D. R., Heydenreich, F., Lewis, M. R., Bennett, M. H., Razzaghi, B., Komorowski, M., Barahona, M., Stumpf, M. P. H., Wigneshweraraj, S., Bundy, J. G., & Buck, M. (2013). Nitrogen and carbon status are integrated at the transcriptional level by the nitrogen regulator NtrC in vivo. *MBio*, 4(6), e00881-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00881-13>
- Schumperli, D., McKenney, K., Sobieski, D. A., & Rosenberg, M. (1982). Translational coupling at an intercistronic boundary of the Escherichia coli galactose operon. *Cell*, 30, 865–871.
- Schwoppe, C., Winkler, H. H., & Neuhaus, H. E. (2003). Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1450–1457. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03507.x>
- Scott, D. E., Spry, C., & Abell, C. (2016). *Differential Scanning Fluorimetry as part of a biophysical screening cascade*. <https://doi.org/10.1002/9783527683604.ch07>

- Sepulveda, E., & Lupas, A. N. (2017). Characterization of the CrbS/R two-component system in *Pseudomonas fluorescens* reveals a new set of genes under its control and a DNA motif required for CrbR-mediated transcriptional activation. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02287>
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D. R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G. M., Bott, M., Griesinger, C., & Becker, S. (2008). A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *Journal of Molecular Biology*, 377, 512–523.
- Shi, L., & Hulett, F. M. (1999). The cytoplasmic kinase domain of PhoR is sufficient for the low phosphate-inducible expression of Pho regulon genes in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 31(1), 211–222.
- Shin, D., Lee, E. J., Huang, H., & Groisman, E. A. (2006). A positive feedback loop promotes transcription surge that jump-starts *Salmonella* virulence circuit. *Science*, 314, 1607–1609.
- Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M., Zhang, X.-X., Moon, C. D., Gehrig, S. M., Godfrey, S. A., Knight, C. G., Malone, J. G., Robinson, Z., Spiers, A. J., Harris, S., Challis, G. L., Yaxley, A. M., Harris, D., Seeger, K., Murphy, L., Rutter, S., Squares, R., Quail, M. A., Saunders, E., Mavromatis, K., Brettin, T. S., Bentley, S. D., Hotherhall, J., Stephens, E., Thomas, C. M., Parkhill, J., Levy, S. B., Rainey, P. B., & Thomson, N. R. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology*, 10(5), R51. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-r51>
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Silva-Jiménez, H., Ortega, Á., García-Fontana, C., Ramos, J. L., & Krell, T. (2015). Multiple signals modulate the activity of the complex sensor kinase TodS. *Microbial Biotechnology*, 8(1), 103–115. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12142>
- Silversmith, R. E. (2010). Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 177–183.
- Skerker, J. M., Perchuk, B. S., Siryaporn, A., Lubin, E. A., Ashenberg, O., Goulian, M., & Laub, M. T. (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell*, 133(6), 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.040>
- Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A. A., Xu, Z., & Ninfa, A. J. (2004). Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 43, 6670–6678.

- Sonnleitner, E., Abdou, L., & Hass, D. (2009). Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 21866–21871.
- Sonnleitner, E., & Bläsi, U. (2014). Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genetics*, 10(6), e1004440. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004440>
- Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A. S., Backofen, R., Williams, P., Hüttenhofer, A., Haas, D., & Bläsi, U. (2011). The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Molecular Microbiology*, 80(4), 868–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07620.x>
- Sonnleitner, E., Prindl, K., & Bläsi, U. (2017). The *Pseudomonas aeruginosa* CrcZ RNA interferes with Hfq-mediated riboregulation. *PLOS ONE*, 12(7), e0180887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180887>
- Sonnleitner, E., Valentini, M., Wenner, N., Haichar, F.-Z., Haas, D., & Lapouge, K. (2012). Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 7(10), e44637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044637>
- Sonnleitner, E., Wulf, A., Campagne, S., Pei, X.-Y., Wolfinger, M. T., Forlani, G., Prindl, K., Abdou, L., Resch, A., Allain, F. -T., Luisi, B. ., Urlaub, H., & Bläsi, U. (2018). Interplay between the catabolite repression control protein Crc, Hfq and RNA in Hfq-dependent translational regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research*, 46(3), 1470–1485. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1245>
- Soper, T. J., & Woodson, S. A. (2008). The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA*, 14(9), 1907e1917.
- Sourjik, V., & Wingreen, N. S. (2012). Responding to chemical gradients: Bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.008>
- Staroń, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H., & Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74(3), 557–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06870.x>
- Steinmetz, P. A., Wörner, S., & Uden, G. (2014). Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli* : function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C4 -dicarboxylate sensor. *Molecular Microbiology*, 94(1), 218–229.

- Stevenson, L. H., & Socolofsky, M. D. (1966). Cyst formation and poly-beta- hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*, 91, 304–310.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two- component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183–215.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Studholme, D. J., & Dixon, R. (2003). Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1757–1767.
- Swem, L. R., Gong, X., Yu, C.-A., & Bauer, C. E. (2006). Identification of a ubiquinone-binding site that affects autophosphorylation of the sensor kinase RegB. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6768–6775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509687200>
- Szakács, G., Váradi, A., Özvegy-Laczka, C., & Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). *Drug Discovery Today*, 13(9–10), 379–393. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>
- Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. ., & Arrow, A. . (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51, 439–457.
- Takada, H., & Yoshikawa, H. (2018). Essentiality and function of Walk/WalR two-component system: the past, present, and future of research. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(5), 741–751. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444466>
- Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(2), 479–506. <https://doi.org/1092-2172/99>
- Tetsch, L., & Jung, K. (2009a). How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? Transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids*, 37(3), 467–477. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0235-x>
- Tetsch, L., & Jung, K. (2009b). The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Molecular Microbiology*, 73(6), 982–991.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06847.x>

- Thevelein, J. M., & Voordeckers, K. (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Molecular Biology and Evolution*, 26(11), 2407–2414. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp168>
- Timmis, K. N. (2002). *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology*, 4, 779–781.
- Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H. D., & Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental Microbiology*, 10, 1690–1702.
- Ukaegbu, U. E., & Rosenzweig, A. C. (2009). Structure of the redox sensor domain of *Methylococcus capsulatus* (Bath) MmoS. *Biochemistry*, 48, 2207–2215.
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V., & Zhulin, I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology*, 13, 52–56.
- Utsumi, R., Brissette, R., Rampersaud, A., Forst, S., Oosawa, K., & Inouye, M. (1989). Activation of bacterial porin gene expression by a chimeric signal transducer in response to aspartate. *Science*, 245, 1246–1249.
- Valderrama, J. A., Gómez-Álvarez, H., Martín-Moldes, Z., Berbís, M. Á., Cañada, F. J., Durante-Rodríguez, G., & Díaz, E. (2019). A novel redox-sensing histidine kinase that controls carbon catabolite repression in *Azoarcus* sp. CIB. *MBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00059-19>
- Valentini, M., Garcia-Maurino, S. M., Perez-Martinez, I., Santero, E., Canosa, I., & Lapouge, K. (2014). Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology*, 160(Pt\_10), 2243–2252. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078873-0>
- Vargiu, A. V., Pos, K. M., Poole, K., & Nikaido, H. (2016). Editorial: Bad Bugs in the XXIst Century: Resistance mediated by multi-drug efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00833>
- Västermark, Å., & Saier, M. H. (2014). The involvement of transport proteins in transcriptional and metabolic regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.002>
- Večerek, B., Moll, I., & Bläsi, U. (2007). Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO Journal*, 26(4), 965–975. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601553>

- Venturi, V., Ottevanger, C., Bracke, M., & Weisbeek, P. (1995). Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Molecular Microbiology*, 15(6), 1081–1093. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02283.x>
- Verhamme, D. T., Postma, P. W., Crielaard, W., & Hellingwerf, K. J. (2002). Cooperativity in signal transfer through the Uhp system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184, 4205–4210.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Médigue, C., & Boccard, F. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature Biotechnology*, 24, 673–679.
- Vogel, J., & Luisi, B. F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 578–589. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2615>
- Vreede, J., van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J., Crielaard, W., & van Aalten, D. M. F. (2003). PAS Domains. Common structure and common flexibility. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18434–18439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301701200>
- Wackett, L. P. (2003). *Pseudomonas putida* - a versatile biocatalyst. *Nature Biotechnology*, 21, 136–138.
- Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 1024–1037. <https://doi.org/10.1038/nrm1524>
- Waldron, T. T., & Murphy, K. P. (2003). Stabilization of proteins by ligand binding: Application to drug screening and determination of unfolding energetics. *Biochemistry*, 42, 5058–5064.
- Wang, N., She, Z., Ingar, Z., Martic, S., & Kraatz, H.-B. (2017). A bioorganometallic approach to study histidine kinase autophosphorylations. *Chemistry - A European Journal*, 23(13), 3152–3158. <https://doi.org/10.1002/chem.201605253>
- Wassenaar, T. M., Wanchai, V., Alkam, D., Nookaew, I., & Ussery, D. W. (2018). Conservation of two-component signal transduction systems in *E. coli*, *Salmonella*, and across 100,000 bacteria of various bacterial phyla. In P. H. Rampelotto (Ed.), *Molecular mechanisms of microbial evolution* (pp. 153–174). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69078-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69078-0_7)
- Watanabe, A., Choe, S., Chaptal, V., Rosenberg, J. M., Wright, E. M., Grabe, M., & Abramson, J. (2010). The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature*, 468(7326), 988–991. <https://doi.org/10.1038/nature09580>
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J., & Kustu, S. (1991). The phosphorylated form of the

- enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell*, 67(1), 155–167. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90579-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90579-N)
- West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 369–376.
- Whitney, J. C., Colvin, K. M., Marmont, L. S., Robinson, H., Parsek, M. R., & Howell, P. L. (2012). Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 23582–23593.
- Whitworth, D. E., & Cock, P. J. A. (2009, September 25). Evolution of prokaryotic two-component systems: Insights from comparative genomics. *Amino Acids*, Vol. 37, pp. 459–466. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0259-2>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P. C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., & Buck, M. (2008, May). Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the  $\sigma 54$  promoter-specificity factor. *Molecular Microbiology*, Vol. 68, pp. 538–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06181.x>
- Williams, P. A., & Murray, K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *Journal of Bacteriology*, 120, 416–423.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Research*, 44, D646–653.
- Wirtz, L., Eder, M., Schipper, K., Rohrer, S., & Jung, H. (2020). Transport and kinase activities of CbrA of *Pseudomonas putida* KT2440. *Scientific Reports*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62337-9>
- Wong, S. M., & Mekalanos, J. J. (2002). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10191–10196. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>
- Wösten, M. M. S., Kox, L. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C., & Groisman, E. A. (2000). A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell*, 103(1), 113–125. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00092-1)

- Wu, B., Ottow, K., Poulsen, P., Gaber, R. F., Albers, E., & Kielland-Brandt, M. C. (2006). Competitive intra- and extracellular nutrient sensing by the transporter homologue Ssy1p. *Journal of Cell Biology*, 173(3), 327–331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602089>
- Wu, J., Cheng, Z., Reddie, K., Carroll, K., Hammad, L. A., Karty, J. A., & Bauer, C. E. (2013). RegB kinase activity is repressed by oxidative formation of cysteine sulfenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 4755–4762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413492>
- Wuichet, K., Cantwell, B. J., & Zhulin, I. B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 219–225.
- Wuichet, K., & Zhulin, I. B. (2010). Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Science Signaling*, 3(128), ra50–ra50. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000724>
- Xia, Y., Wang, D., Pan, X., Xia, B., Weng, Y., Long, Y., Ren, H., Zhou, J., Jin, Y., Bai, F., Cheng, Z., Jin, S., & Wu, W. (2020). TpiA is a Key Metabolic Enzyme That Affects Virulence and Resistance to Aminoglycoside Antibiotics through CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 11(1), 1–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02079-19>
- Yamaguchi, A., Nakashima, R., & Sakurai, K. (2015). Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00327>
- Yan, N. (2015). Structural biology of the Major Facilitator Superfamily transporters. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 257–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M., & Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), 7564–7569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801093105>
- Yang, H., Lu, X., Hu, J., Chen, Y., Shen, W., & Liu, L. (2018). Boosting secretion of extracellular protein by *Escherichia coli* via cell wall perturbation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(20), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.01382-18>
- Yang, N., Ding, S., Chen, F., Zhang, X., Xia, Y., Di, H., Cao, Q., Deng, X., Wu, M., Wong, C. C. L., Tian, X.-X., Yang, C.-G., Zhao, J., & Lan, L. (2015). The Crc protein participates in down-regulation of the Lon gene to promote rhamnolipid production and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 96(3), 526–547. <https://doi.org/10.1111/mmi.12954>
- Yang, Y., & Inouye, M. (1993). Requirement of both kinase and phosphatase activities of an *Escherichia coli* receptor (Taz1) for ligand-dependent signal transduction. *Journal of Molecular Biology*, 231, 335–342.



- Yeung, A. T. Y., Bains, M., & Hancock, R. E. W. (2011). The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 193(4), 918–931. <https://doi.org/10.1128/JB.00911-10>
- Young, J. M., & Park, D. C. (2007). Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2894–2901. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64969-0>
- Yuste, L., Hervás, A. B., Canosa, I., Tobes, R., Jiménez, J. I., Nogales, J., Pérez-Pérez, M. M., Santero, E., Díaz, E., Ramos, J. L., De Lorenzo, V., & Rojo, F. (2006). Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environmental Microbiology*, 8(1), 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00890.x>
- Zhang, L., Gao, Q., Chen, W., Qin, H., Hengzhuang, W., Chen, Y., Yang, L., & Zhang, G. (2013). Regulation of pqs quorum sensing via catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 159(Pt\_9), 1931–1936. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066266-0>
- Zhang, W., Yan, C., Shen, J., Wei, R., Gao, Y., Miao, A., Xiao, L., & Yang, L. (2019). Characterization of aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas mendocina* strain GL6 and its potential application in wastewater treatment plant effluent. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph16030364>
- Zhang, X., Chaney, M., Wigneshweraraj, S. R., Schumacher, J., Bordes, P., Cannon, W., & Buck, M. (2002). Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Molecular Microbiology*, Vol. 45, pp. 895–903. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03065.x>
- Zhang, X. X., Gauntlett, J. C., Oldenburg, D. G., Cook, G. M., & Rainey, P. B. (2015). Role of the transporter-like sensor kinase CbrA in histidine uptake and signal transduction. *Journal of Bacteriology*, 197(17), 2867–2878. <https://doi.org/10.1128/JB.00361-15>
- Zhang, X. X., & Rainey, P. B. (2008). Dual involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics*, 178(1), 185–195. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.081984>
- Zhou, Y.-F., Nan, B., Nan, J., Ma, Q., Panjikar, S., Liang, Y.-H., Wang, Y., & Su, X.-D. (2008). C4-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain. *Journal of Molecular Biology*, 383(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.010>
- Zhu, Y., & Inouye, M. (2002). The role of the G2 box, a conserved motif in the histidine kinase superfamily, in modulating the function of EnvZ. *Molecular Microbiology*, 45(3), 653–663.
- Zhulin, I. B., Taylor, B. L., & Dixon, R. (1997). PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors

for oxygen and redox. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 331–333.

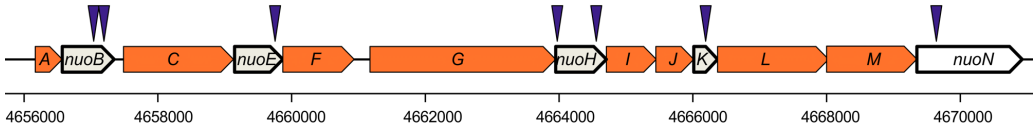
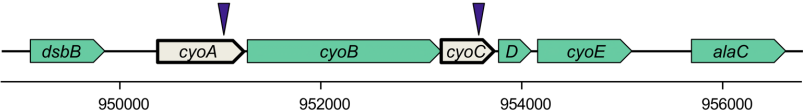

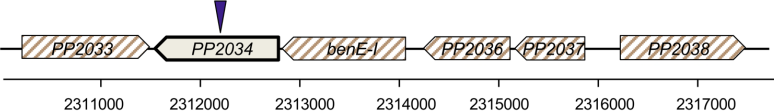
Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>

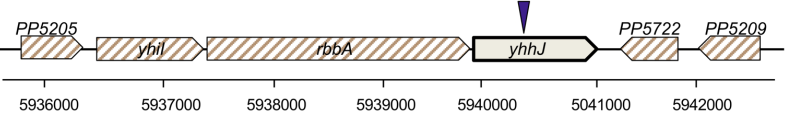
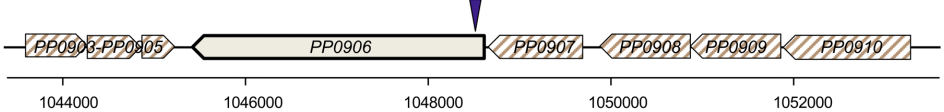
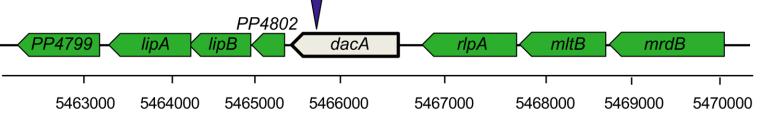
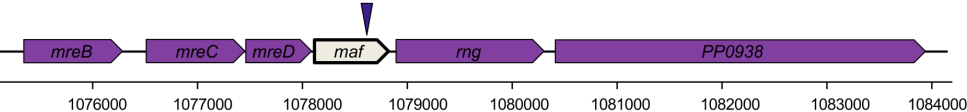
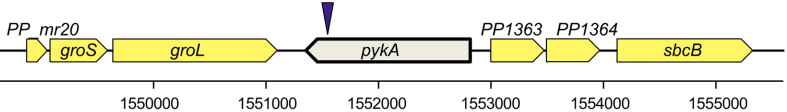
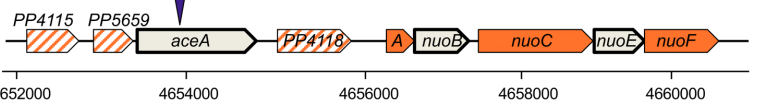
Zu, Y., Li, W., Wang, Q., Chen, J., & Guo, Q. (2019). ComDE two-component signal transduction systems in oral Streptococci: Structure and function. *Current Issues in Molecular Biology*, 201–258. <https://doi.org/10.21775/cimb.032.201>

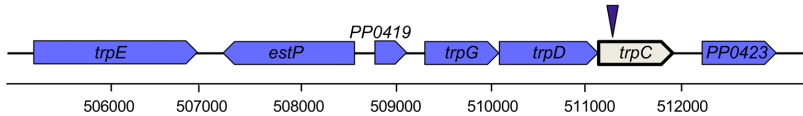
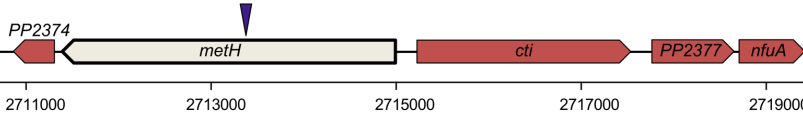
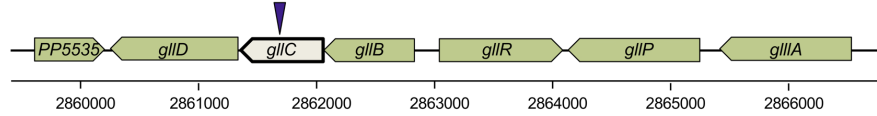
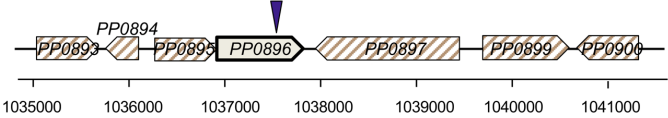

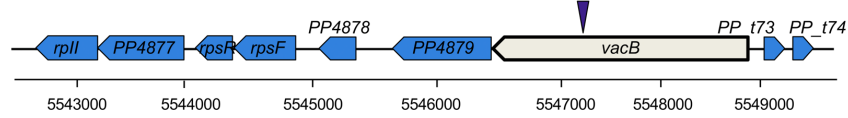
## ANEXOS



**Anexo I. Clasificación de los genes interrumpidos por el transposón miniTn5-Km en los mutantes resistentes a estreptomicina seleccionados.** Los triángulos invertidos azules indican el lugar de inserción del transposón miniTn5-Km. Los genes interrumpidos por el transposón miniTn5-Km se colorean en blanco y su contorno se resaltan en negrita mientras que los genes adyacentes al gen interrumpido se representan en diferentes colores. La barra horizontal inferior indica las coordenadas del genoma de *P. putida* KT2442. Ni: número de inserciones mapeadas en los mutantes resistentes a Sm.

Gen (ID)	Producto génico	Contexto genómico	N <sub>i</sub>	Mutantes
<b>Transporte de electrones y cadena respiratoria</b>				
<i>nuo</i> (PP4119-31)	NADH quinona oxidoreductasa		7	MPO952, MPO959, MPO958, MPO971, MPO965
<i>cyo</i> (PP0812-16)	Citocromo <i>bo</i> <sub>3</sub> oxidasa terminal		2	MPO954, MPO961
<i>PP2379</i>	Proteína de la familia Sco1/SenC de ensamblaje de citocromo oxidasa		1	MPO953
<b>Transporte de membrana</b>				
<i>PP2034</i>	Proteína de membrana tipo MSF		1	MPO957

<i>yhhJ</i> (PP5208)	Transportador tipo ABC		1	MPO955
<i>PP0906</i>	Transportador tipo RND		1	MPO966
<b>Pared celular</b>				
<i>dacA</i> (PP4803)	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa		1	MPO968
<i>maf</i> (PP0936)	Proteína de formación del septum		1	MPO963
<b>Metabolismo central</b>				
<i>pykA</i> (PP1362)	Piruvato quinasa II		1	MPO969
<i>aceA</i> (PP4116)	Isocitrato liasa		1	MPO956

Metabolismo de aminoácidos					
<i>trpC</i> (PP0422)	Indol 3-glicerol fosfato sintasa		1	MPO970	
<i>metH</i> (PP2375)	Metionina sintetasa dependiente de cobalamina		1	MPO962	
Catabolismo de compuestos orgánicos aromáticos o nitrogenados					
<i>gllC</i> o <i>galC</i> (PP2514)	Ácido 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadípico aldolasa		1	MPO972	
<i>PP0896</i>	Hidrolasas de enlaces carbono-nitrógeno		1	MPO967	
Procesamiento de ARN					
<i>mnmG</i> o <i>trmF</i> (PP0004)	Enzima modificadora de 5-carboximetilaminometilo uridina ARN <sub>t</sub>		8	MPO951	
<i>vacB</i> o <i>mr</i> (PP4880)	Ribonucleasa R		1	MPO960	

<p><i>rsmE</i> (PP4985)</p>	<p>ARNr 16S (uracilo<sup>1498</sup>-N<sup>3</sup>)- metiltransferasa</p>	<p>Genomic map showing the <i>rsmE</i> gene (PP4985) and surrounding genes: <i>yceI</i>, <i>yceJ</i>, <i>PP4983</i>, <i>bioA</i>, <i>PP4986</i>, and <i>PP4987</i>. The <i>rsmE</i> gene is highlighted with a black border and a purple arrow pointing to its start. The map is aligned with a scale from 5675000 to 5682000.</p>	<p>1</p>	<p>MPO964</p>
---------------------------------	--	--	----------	---------------